



Attorney Docket No. 01149/HG

**IN THE UNITED STATES PATENT
AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant(s): Yuki ABE et al

Serial No. : 09/836,705

Filed : April 17, 2001

For : GENES FROM A GENE
CLUSTER

Art Unit : 1645

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Assistant Commissioner for Patents

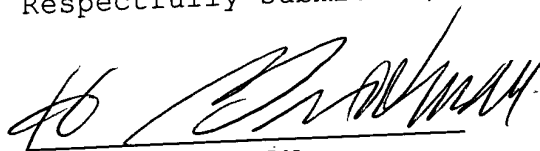
S I R :

Enclosed are certified copies; priority is claimed under

35 USC 119.

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
Japan	2000-116591	April 18, 2000
Japan	2000-117458	April 19, 2000

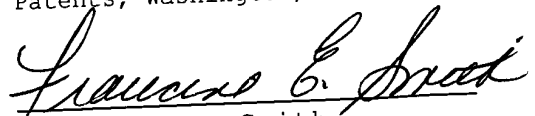
Respectfully submitted,


HERBERT GOODMAN
Reg. No. 17,081

Frishauf, Holtz, Goodman,
Langer & Chick, P.C.
767 Third Avenue - 25th Floor
New York, NY 10017-2023
Telephone: (212) 319-4900
Facsimile: (212) 319-5101
HG/fs

"Express Mail Mailing Label
No.: EL 797383786 US

Date of Deposit: October 11, 2001
I hereby certify that this paper is
being deposited with the United
States Postal Service "Express Mail
Post Office to Addressee" service
under 37 CFR 1.10 on the date
indicated above and is addressed to
the Assistant Commissioner for
Patents, Washington, D.C. 20231


Francine E. Smith

In the event that this Paper is late
filed, and the necessary petition for
extension of time is not filed
concurrently herewith, please
consider this as a Petition for the
requisite extension of time, and to
the extent not tendered by check
attached hereto, authorization to
charge the extension fee or any other
fee required in connection with this
paper, to Account No. 06-1378.

#4



USSN 09/ 836, 705
GRP ART UNIT 1645

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 4月18日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-116591

出 願 人

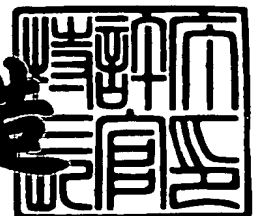
Applicant(s):

三共株式会社

2001年 4月20日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3034006

【書類名】 特許願

【整理番号】 2000044SW

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/31

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社
社内

【氏名】 阿部 有生

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社
社内

【氏名】 小野 千穂

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社
社内

【氏名】 吉川 博治

【特許出願人】

【識別番号】 000001856

【氏名又は名称】 三共株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081400

【弁理士】

【氏名又は名称】 大野 彰夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100092716

【弁理士】

【氏名又は名称】 中田 ▲やす▼雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096666

【弁理士】

【氏名又は名称】 室伏 良信

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010216

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704937

【包括委任状番号】 9704935

【包括委任状番号】 9704936

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】ML-236B生合成促進cDNA (E)

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の群から選択されるDNA。

(a) 配列表の配列番号37のヌクレオチド番号1乃至1662で示される塩基配列を1つ又は複数含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA：

(b) (a) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA。

【請求項2】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499株 (FERM BP-7005) より得ることができる、請求項1記載のDNA。

【請求項3】請求項1又は2記載のDNAを含む組換えDNAベクター。

【請求項4】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499株 (FERM BP-7005) に保持される、請求項3記載の組換えDNAベクター。

【請求項5】請求項3又は4記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項6】ML-236B生産菌であることを特徴とする請求項5記載の宿主細胞。

【請求項7】ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、請求項6記載の宿主細胞。

【請求項8】請求項6又は7記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。

【請求項9】大腸菌であることを特徴とする、請求項5記載の宿主細胞。

【請求項10】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499 (FERM BP-7005) である、請求項9記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HMG-C_oA還元酵素阻害剤ML-236B生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA、該DNAを組み込んだ組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞の培養物からML-236Bを回収することを特徴とするML-236Bの製造法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

プラバスタチンナトリウムは高脂血症改善薬として臨床において使用されているHMG-C_oA還元酵素阻害剤である。プラバスタチンは、ペニシリウム・シトリナムが生産するML-236Bをストレプトミセス・カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) により微生物変換することにより得られる (Endo, A., et al., J. Antibiot., 29, 1346 (1976) : Matsuoka, S., et al., Eur. J. Biochem., 184, 707 (1989) 記載 : 特開昭 57-2240 号公報記載)。

【0003】

プラバスタチンの前駆体ML-236B、及び、プラバスタチンと部分構造を共有するHMG-C_oA阻害剤ロバスタチンは、ともにポリケチドを経て生合成されることが示されている (Moore, R.N., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 3694 (1985) : Shiao, M. and Don, H.S., Proc. Natl. Sci. Counc. ROC., 11, 223 (1987) 記載)。

【0004】

ポリケチドとは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低分子カルボン酸残基の連続的な縮合反応から生じるβ-ケト炭素鎖から導かれる化合物の総称であり、各β-ケトカルボニル基の縮合・還元様式により、多様な構造が導かれる (Hopwood, D.A. and Sherman, D.H., Annu. Rev. Genet., 24, 37-66 (1990) : Hutchinson, C.R. and Fujii, I., Annu. Rev. Genet., 49, 201-238 (1995) 記載)。

【0005】

ポリケチドの合成を担うポリケチド・シンターゼ (Polyketide S

ynthase : 以下、「PKS」という。)は糸状菌や細菌の有する酵素であることが知られており、糸状菌では該酵素の分子生物学的研究がなされている (Feng, G.H. and Leonard, T.J., J. Bacteriol., 177, 6246 (1995) : Takano, Y., et al. Mol. Gen. Genet. 249, 162 (1995) 記載)。ロバスタチン生産菌であるアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) については、ロバスタチン生合成に関連した PKS 遺伝子の解析がなされている (特表平 9-504436 号公報記載)。

【0006】

ところで、糸状菌の二次代謝産物の生合成関連遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成していることが少なくない。ポリケチドの生合成系にて、該系に関与する遺伝子クラスターの存在が知られている。アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) の生産するポリケチドであるアフラトキシンの生合成では、PKS その他ポリケチドの生合成に関与する酵素蛋白質をコードする遺伝子がクラスター構造を形成していることが知られており、両菌のアフラトキシン生合成関連遺伝子のゲノム比較解析が行なわれている (Yu, J., et al, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2365 (1995) 記載)。アスペルギルス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*) の生産するステリグマトシスチンの生合成関連遺伝子は、ゲノム上の連続する約 60 kb の領域においてクラスター構造を形成していることが報告されている (Brown, D.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載)。

【0007】

しかし、ML-236B 生合成に関する分子生物学的研究は、現在まで十分にはなされていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、ペニシリウム・シトリナムの ML-236B 生合成に関連するゲノム DNA (以下、「ML-236B 生合成関連ゲノム DNA」という。)を、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングし、該ゲノム DNA を解析して該ゲノム DNA 上に構造遺伝子を見出し、ペニシリウム・シトリナムの mRNA を鋳型とした逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse tr

anscription - polymerase chain reaction: 以下、「RT-PCR」という。

）により該構造遺伝子に対応するcDNAを得、該cDNAを含む組換えDNAベクターを用いて該生産菌を形質転換することにより、該生産菌においてML-236Bの生合成が促進されることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、

(1)

以下の群から選択されるDNA、

(a) 配列表の配列番号37のヌクレオチド番号1乃至1662で示される塩基配列を1つ又は複数含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA:

(b) (a)記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA、

(2)

形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499株 (FERM BP-7005) より得ることができる、(1)記載のDNA。

(3)

(1)又は(2)記載のDNAを含む組換えDNAベクター、

(4)

形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499株 (FERM BP-7005) に保持される、(3)記載の組換えDNAベクター、

(5)

(3)又は(4)記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、

(6)

ML-236B生産菌であることを特徴とする(4)記載の宿主細胞、

(7)

ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、
(6) 記載の宿主細胞、

(8)

(6) 又は (7) 記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物から ML-236B を回収することを特徴とする、ML-236B の製造法、

(9)

大腸菌であることを特徴とする、(4) 記載の宿主細胞、及び、

(10)

形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499 (FERM BP-7005) である、(9) 記載の宿主細胞、
に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0011】

本発明は、ML-236B 生産菌内に導入されることにより該生産菌の ML-236B 生合成を促進することを特徴とする cDNA (以下、「ML-236B 生合成促進 cDNA」という。) 等に関する。

【0012】

本発明の ML-236B 生合成促進 cDNA は、ML-236B 生産菌のゲノム遺伝子中の ML-236B 生合成関連ゲノム DNA 上に存在する構造遺伝子の転写産物 (メッセンジャー RNA : 以下、「mRNA」という。) を鋳型として合成された DNA (I)、該 DNA 及び該 DNA を第一鎖として合成された第二鎖 DNA が会合して生じる二本鎖 DNA (II)、該二本鎖 DNA をクローニング等の手法により複製若しくは増幅することによって得られる二本鎖 DNA (III)、又は、これら DNA のいずれか一つとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA (IV) である。(IV) の DNA としては、配列表の配列番号 37 のヌクレオチド番号 1 乃至 1662 に示される塩基配列に 1 つ又は複数のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加が生じたものであり、ML-23

6 B 生産菌内に導入されることにより該菌の ML-236 B の生合成を促進するものである。なお、本発明において、ハイブリダイズとは、2 本の一本鎖核酸同士が互いに相補的な領域又は相補性の高い領域において二本鎖を形成することをいい、ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション液の組成が 6×SSC (1×SSC の組成は、150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム。) であり且つハイブリダイゼーションを行なう際の保温温度が 55℃ の場合をいう。

【0013】

このような ML-236 B 生合成促進 cDNA は、ML-236 b 生産菌の cDNA ライブラリーから所望の cDNA を含むクローンを単離する方法、又は ML-236 B 生合成関連 DNA の塩基配列に基いて作製される一組のプライマー及び ML-236 B 生産菌の mRNA 若しくは全 RNA を使用する RT-PCR により得ることができる。

【0014】

本発明において、ML-236 B 生産菌とは、ML-236 B 生産能を先天的に有する微生物をいう。ML-236 B 生産菌としては、例えば、ペニシリウム (*Penicillium*) 属に属する ML-236 B 生産菌が挙げられ、ペニシリウム・シトリナム、ペニシリウム・ブレビコンパクタム (*Penicilium brevicompactum* : Brown, A.G., et al., J.Chem.Soc.Perkin-1., 1165 (1976) 記載)、ペニシリウム・シクロピウム (*Penicillium cyclopium* : Doss, S.L., et al., J.Natl.Prod., 49, 357 (1986) 記載) 等が例示される。さらに、これら以外に、ユーペニシリウム・エスピー M6603 (*Eupenicillium* sp. M6603 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載)、ペシロミセス・ビリディス FERM P-6236 (*Paecilomyces viridis* FERM P-6236 : 特開昭 58-98092 号公報記載)、ペシロミセス・エスピー M2016 (*Paecilomyces* sp. M2016 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載)、トリコデルマ・ロンギブラチアタム M6735 (*Trichoderma longibrachiatum* M6735 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載)、ヒポミセス・クリソスペルムス IFO 7798 (*Hypomyces chrysospermus* IFO 7798 : Endo, A., et al., J.Antib

iot.-Tokyo,39,1609(1986)記載)、グリオクラディウム・エスピー YJ-9515 (Gliocladium sp. YJ-9515: WO 9 8 0 6 8 6 7 号公報記載)、トリコデルマ・ピリデ IFO 5836 (Trichoderma viride IFO 5836: 特公昭62-1915号公報記載)、ユーペニシリウム・レチクリスポルム IFO 9022 (Eupenicillium reticulisporum IFO 9022: 特公昭62-19159号公報記載)等が挙げられる。これらのML-236B生産菌のうち、好適にはペニシリウム・シトリナムであり、より好適にはペニシリウム・シトリナム SANK13380株である。ペニシリウム・シトリナム SANK13380株は、平成4年(1992年)12月22日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-4129を付与された。

【0015】

ML-236B生合成関連ゲノムDNAは、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーに対して、類似の機能を有するものと推測される糸状菌由来のDNAの塩基配列に基いて設計されるプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより得ることができる。

【0016】

ゲノムDNAライブラリーの作製法としては、通常真核生物のゲノムDNAライブラリーを作製するための方法であれば特に限定されないが、例えば、マニァティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) 等が挙げられる。

【0017】

ML-236B生産菌のゲノムDNAは、該生産菌培養物から菌体を回収して物理的に破碎した後、核内DNAを抽出、精製することにより得られる。

【0018】

ML-236B生産菌の培養は、各ML-236B生産菌に適した条件下で行なうことができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌体を培養したスラントから、MBG3-8培地(組成; 7%(w

/v)グリセリン、3%(w/v)グルコース、1%(w/v)大豆粉、1%(w/v)ペプトン（極東製薬工業（株）製）、1%(w/v)コーンステープリカー（ホーネンコーポレーション（株）製）、0.5%(w/v)硝酸ナトリウム、0.1%(w/v)硫酸マグネシウム七水和物、pH6.5）へ該菌体を接種し、22乃至28℃、3乃至7日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。該スラントは、溶解させたPGA寒天培地（組成；200g/L馬鈴薯抽出液、15%(w/v)グリセリン、2%(w/v)寒天）を試験管に注ぎ、傾斜させつつ固化させたものに、白金耳を用いてペニシリウム・シトリナムを接種し、22乃至28℃、7乃至15日保温することにより作製する。該スラントを0乃至4℃で保存することにより、該スラント上で該菌を継続的に生存させることができる。

【0019】

液体培地で培養したML-236B生産菌の菌体は、遠心分離により、固体培地で培養した該菌の菌体は、セル・スクレーパー等のかきとることにより、それぞれ回収することができる。

【0020】

菌体の物理的破碎は、菌体を液体窒素等で凍結しつつ乳鉢と乳棒ですり潰すことにより行なうことができる。破碎された菌体の核内DNAの抽出は、ドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulphate：以下、「SDS」という。）等の界面活性剤を用いて行なうことができる。抽出されたゲノムDNAは、フェノール・クロロホルム抽出を行なうことにより除タンパクされ、エタノール沈澱を行なうことにより沈澱として回収することができる。

【0021】

得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で限定分解させ、断片化する。限定分解に使用される制限酵素としては、通常入手可能な制限酵素であれば特に限定されないが、例えば、Sau3AI等を挙げることができる。断片化されたDNAをゲル電気泳動に供し、適当なサイズのゲノムDNAを含むゲルからDNAを回収する。DNA断片のサイズには特に限定はないが、好適には20kb以上である。

【0022】

ゲノムDNAライブラリー作製のDNAベクターとしては、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、BACベクター等が挙げられ、好適にはコスミドベクターである。また、これらDNAベクターは発現ベクターであってもよい。さらに、該DNAベクターは、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞に表現形質（表現型；Phenotype）の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

【0023】

該DNAベクターは、クローニング及び機能発現の双方に適用できるものであることが好ましい。該DNAベクターとしては、複数の微生物群に形質転換可能なDNAベクター、すなわちシャトルベクターを用いることが好ましい。該シャトルベクターは、少なくとも一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有する。また、シャトルベクターは複数の微生物群の宿主にそれぞれ表現形質の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

【0024】

このようなシャトルベクターにより形質転換される微生物群の組合わせとしては、一方の微生物群がクローニングに適用でき且つ他方がML-236B生産能を有していれば特に限定されないが、例えば、細菌及び糸状菌の組合わせ、酵母及び糸状菌の組合わせ等が挙げられ、好適には細菌及び糸状菌の組合わせである。細菌としては、通常遺伝子工学に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌等を挙げることができ、好適には大腸菌であり、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株である。酵母としては、通常遺伝子工学に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等を挙げるができる。糸状菌としては、上述のML-236B生産菌等が挙げられる。なお、本発明において微生物群は、細菌、糸状菌及び酵母から選択される。

【0025】

このようなシャトルベクターとしては、例えば、適当な表現型選択マーカー遺

伝子及びコス（cos）部位を有するコスミドベクター等を挙げることができ、好適には大腸菌ハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子配列を有するプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）にコスミドベクターpWE15（STRATAGENE社製）の有するコス（cos）部位を挿入して作製されたpSAKcos1が挙げられるが、これらに限定されない。pSAKcos1の構築手順については図1に記載されている。

【0026】

上述のML-236B生産菌ゲノムDNA断片をライゲーションしたシャトルベクターを宿主細胞に導入することにより、所望のゲノムDNAライブラリーが完成する。宿主細胞には、好適には大腸菌、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株がそれぞれ使用される。宿主細胞が大腸菌の場合、該導入はin vitroパッケージングにより行なう。本発明において、形質転換とは、in vitroパッケージングによる外来DNAの導入も意味し、in vitroパッケージングにより外来DNAを導入された細胞も形質転換細胞の意味に包含される。

【0027】

所望のクローンのスクリーニングには、抗体又は核酸プローブを用い、好適には、核酸プローブを用いる。該核酸プローブは、糸状菌のポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて作製することができる。このような遺伝子としては、ポリケチドの生合成への関与が確認され且つ塩基配列が公知のものであれば特に限定されないが、例えば、アスペルギルス・フラヴァス（*Aspergillus flavus*）、アスペルギルス・パラシティカス（*Aspergillus parasiticus*）のアフラトキシンPKS遺伝子、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）のストリグマトシスチンPKS遺伝子等を挙げることができる。

【0028】

該核酸プローブは、上述の公知の塩基配列に基づいて、ゲノムDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプローブの合成により、またオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、ゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：以下、「PCR」という

。 : Saiki, R.K., et al., Science, 239, 487 (1988) 記載) を行なうことにより、又は、mRNAを鋳型としたRT-PCR等により、取得することができる。

【0029】

核酸プローブのML-236B生産菌からのPCR又はRT-PCRによる取得方法は、以下の通りである。PCR又はRT-PCRに使用するプライマー（以下、「PCR用プライマー」という。）の設計は、塩基配列が公知であるところのポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて、好適にはアスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシンPKS遺伝子又はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。これらのうちいずれか一つのPKSのアミノ酸配列上で種間保存性の高いアミノ酸配列を塩基配列に還元することにより、PCR用プライマーを設計することができる。アミノ酸配列から塩基配列に還元する方法としては、宿主のコドン使用頻度を考慮して単一の配列を導く方法又は多重コドンを使用して混合配列（以下、「ミックス・プライマー」という。）を導く方法の二通りが使用できる。後者の場合、塩基配列にヒポキサンチンを含むさせることにより多重度を下げることができる。

【0030】

また、PCR用プライマーには、鋳型鎖とアニーリングするための塩基配列に加え、該プライマーの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

【0031】

さらに、PCR用プライマーの設計においては、グアニン塩基の数とシトシン塩基の数の和が総塩基数の40乃至60%であることが好ましい。また、自己アニーリングし難いことが好ましい。一組のPCR用プライマーにおいては、双方のPCR用プライマー同士がアニーリングし難いことが好ましい。

【0032】

また、PCR用プライマーの塩基数は、PCRに適用できれば特に限定されないが、その範囲の下限は10乃至14、上限は40乃至60であり、好適な範囲は14乃至40である。

【0033】

さらに、PCR用プライマーは、好適にはDNAである。該プライマーを構成するヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシチミジン及びデオキシグアノシンに加え、デオキシイノシンが挙げられる

また、PCR用プライマーの5' -末端に位置するヌクレオシドの5' -位は、水酸基であるか、又は、該水酸基に一リン酸がエステル結合した状態である。

【0034】

さらに、PCR用プライマーの合成は、通常核酸の合成に使用される方法、例えば、ホスフォロアミダイト法により行なうことができ、このような方法には、DNA自動合成機が好適に使用される。

【0035】

PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のゲノムDNAが、RT-PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のmRNAが、それぞれ使用できる。なお、RT-PCRの鋳型としては、mRNAの代わりに全RNAを使用することも可能である。

【0036】

PCR産物又はRT-PCR産物をこのものに適したDNAベクターに組込むことにより、該PCR産物又はRT-PCR産物をクローニングすることができる。該クローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。また、PCR産物又はRT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。) が好適に使用される。

【0037】

クローニングしたPCR産物の取得は、所望のPCR産物を含んでいることを確認した形質転換宿主細胞を培養し、該細胞からプラスミドを抽出、精製し、得られたプラスミドから挿入DNA断片を回収することにより行なうことができる。

【0038】

形質転換宿主細胞の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB培地（1%（w/v）トリプトン、0.5%（w/v）イーストエキストラクト、0.5%（w/v）塩化ナトリウム）で、30乃至37℃、18時間乃至2日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。

【0039】

形質転換宿主細胞の培養物からのプラスミドの調製は、該宿主細胞の菌体を回収し、ゲノムDNAやタンパク質を除去することによりなされる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養物からのプラスミドの調製は、マニアティスらのアルカリ法（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載）により行なうことができる。また、より純度の高いプラスミドを得るためのキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Mini Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。さらに、プラスミドの大量調製を行うキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Maxi Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。

【0040】

得られたプラスミドのDNA濃度は、DNA試料を適宜希釈して波長260 nmにおける吸光度を測定し、吸光度1 = DNA 50 μ g/mlとして算出することができる。DNAの純度は、波長280及び260 nmの吸光度の比率から算出することができる。

【0041】

核酸プローブの標識は、放射性標識及び非放射性標識に大別される。放射性標識に使用される放射性核種としては、通常使用されるものであれば特に限定され

ないが、例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 等を挙げることができ、好適には ^{32}P である。非放射性標識に用いる試薬としては、通常核酸の標識に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、ジゴキシゲニン、ビオチン等が挙げられ、好適にはジゴキシゲニンである。核酸プローブを標識する方法としては、通常使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、標識基質を用いたPCRにより該産物中に取り込ませる方法、ニック・トランスレーション法、ランダム・プライマー法、末端標識法、標識基質を用いてオリゴヌクレオチドDNAを合成する方法等を挙げる事ができ、核酸プローブの種類等によりこれらの方法から適宜選択できる。

【0042】

核酸プローブの塩基配列と同一の塩基配列がML-236B生産菌のゲノム中に存在することは、該生産菌のゲノムDNAに対するサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより確認することができる。

【0043】

サザンブロット・ハイブリダイゼーションは、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により行なうことができる。

【0044】

上述の通り作製された標識核酸プローブを用い、ゲノムDNAライブラリーから目的クローンをスクリーニングすることができる。該スクリーニング法としては、通常遺伝子クローニングに使用される方法であれば特に限定されないが、好適にはコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) を使用することができる。

【0045】

コロニー・ハイブリダイゼーションに用いるコロニーの培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができ、好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB寒天培地 (1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキスト

ラクト、0.5%(w/v)塩化ナトリウム、1.5%(w/v)アガロース)上で、30乃至37℃、18時間乃至2日間保温することにより行なうことができる。

【0046】

コロニー・ハイブリダイゼーションにより得られる陽性クローンからの組換えDNAベクターの調製は、該陽性クローンの培養物からプラスミドを抽出及び精製することによりなされる。

【0047】

本発明において得られた陽性クローンである形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株は、平成11年(1999年)7月7日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。

【0048】

E. coli pML48 SANK71199株が保持する組換えDNAベクターはpML48と命名された。

【0049】

陽性クローンの保持する組換えDNAベクターが所望のML-236B生合成関連ゲノムDNAを含んでいることは、該組換えDNAベクターの挿入塩基配列の決定、サザンブロット・ハイブリダイゼーション又は機能発現により確認できる。

【0050】

DNAの塩基配列は、マキサム・ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A.M.M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980) 記載) 又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982) 記載) 等により決定できる。なお、塩基配列決定に供するプラスミドDNAとしては、より純度の高い標品が好ましい。

【0051】

pML48の挿入塩基配列は配列表の配列番号1に示される。配列表の配列番号2に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列に対して完全に相補的である。通常ゲノムDNAの塩基配列は同種内において遺伝的多型(ポリモル

フィズム：polymorphism)を有している。また、DNAクローニングの過程及び塩基配列決定の過程において、ヌクレオチドの置換等が一定の確率で生じ得る。従って、本発明のML-236B生合成関連ゲノムDNAは、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするゲノムDNA、及び配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするゲノムDNAをも包含する。これらゲノムDNAとしては、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列に1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加が生じたもの、並びにペニシリウム・シトリナム SANK13380株以外のML-236B生産菌に由来するものであり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善する機能を有するものをも包含する。

【0052】

ML-236B生合成関連ゲノムDNAの解析法は次の1)乃至3)に従う。

1) 遺伝子解析ソフトによる解析

ゲノムDNA配列中の遺伝子領域の推定は、既存の遺伝子解析プログラム(Gene Findingプログラム(以下、「GRAIL」という。))、及び配列の相同性検索プログラム(BLASTN及びBLASTX)により行うことができる。

【0053】

GRAILはゲノム配列の「遺伝子配列らしさ」を評価する7つのパラメータに分割し、それらの結果をニューラルネット法を用いて統合することにより、ゲノムDNA上の構造遺伝子を検索するプログラム(Uberbacher,E.C.& Mural,R.J.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,88,11261(1991)記載)であり、Apocom GRAIL Toolkit(APOCOM社製)が好適に使用される。

【0054】

BLASTは核酸配列及びアミノ酸配列の相同性検索を行なうアルゴリズム(Altechul,S.F.,Madden,T.L.,et al.,Nucl.Acids Res.,25,3389(1997)記載)を用

いたプログラムである。

【0055】

ゲノムDNA配列を適当な長さに分割し、BLASTNを用いて遺伝子データベースに対し相同性検索することにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向を推定することができる。また、分割されたゲノムDNA配列を6つの翻訳フレーム（センス配列及びアンチセンス配列に各々3つずつ）に従ってアミノ酸配列に翻訳し、該アミノ酸配列のペプチド・データベースに対する相同性検索をBLASTXを用いて行なうことにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向の推定を行なうこともできる。さらに、真核生物においては、ゲノムDNA配列中に含まれる構造遺伝子のコード領域がイントロン配列により分断されている場合があり、このようなギャップを有する構造遺伝子の解析にはギャップ含有配列用のBLASTがより有効であり、Gapped-BLAST (BLAST2:WISCONSIN GCG package ver. 10.0に搭載) が好適に使用される。

2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法による解析

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法により、1) 記載の解析法により推定される構造遺伝子の発現を調べることができる。

【0056】

ノーザンブロットに供するML-236B生産菌の全RNAは、該菌の培養物より得ることができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌のスラントからMGB3-8培地に該菌を接種し、22乃至28℃、1乃至4日間、振盪しつつ保温することにより行うことができる。

【0057】

ML-236B生産菌からのRNAの抽出は、通常全RNAを調製するのに使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホットフェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられる。また、より純度の高い全RNAを調製するための市販キットとしては、例えば、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製) 等が挙げられる。さらに、mRNAは、全RNAをオリゴ(dT)カラムに添加

し、該カラムに吸着した画分を回収することにより得ることができる。

【0058】

RNAのメンブレンへのトランスファー、プローブの調製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、上述のサザンブロット・ハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる。

3) 5' -末端及び3' -末端の解析

各構造遺伝子の5' -末端及び3' -末端の解析は、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により行なうことができる。RACEは、mRNAを鋳型とし、塩基配列が決定されている領域から塩基配列が決定されていない5' -末端又は3' -末端領域までを含むcDNAを、RT-PCRの応用により取得する方法である (Frohman, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 8998 (1988) 記載)。

【0059】

5' RACEは以下の方法に従う。mRNAを鋳型とし、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA (1) をプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、ターミナルデオキシヌクレオチシルトランスフェラーゼにより該cDNA第一鎖の3' -末端にホモポリメリックな (homopolymeric: 単一塩基からなる) ヌクレオチド鎖を付加させる。該cDNA第一鎖を鋳型とし且つ該ホモポリメリックな塩基配列に相補的な塩基配列を含むセンス側のオリゴヌクレオチドDNA、及び、アンチセンス側に存在し且つオリゴヌクレオチドDNA (1) より3' -側に存在するオリゴヌクレオチドDNA (2) をプライマーとしたPCRによって、5' -末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である (Frohman, M.A., Methods in Enzymol., 218, 340 (1993) 記載)。5' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Version 2.0 (GIBCO社製) 等が好適に使用される。

【0060】

3' RACEは、mRNAの3' -末端に存在するポリA領域を利用する方法

である。すなわち、mRNAを鋳型として、オリゴd (T) アダプターをプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、該cDNA第一鎖を鋳型として、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたセンス側のオリゴヌクレオチドDNA (3)、及び、アンチセンス側のオリゴd (T) アダプターをプライマーとしたPCRによって、3' -末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である。3' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit (Pharmacia社製) が好適に使用される。

【0061】

RACEにおける塩基配列中の公知の部分に基いたプライマーの設計には、上記1) 及び2) の解析結果が好適に利用できる。

【0062】

以上、1) 乃至3) に記載した解析法により、ゲノムDNA配列上の構造遺伝子の方向、並びに、構造遺伝子中の転写開始点の位置、翻訳開始コドンの位置、翻訳終止コドン及びその位置を推定することができる。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子及びそのcDNA、すなわちML-236B生合成促進cDNAを取得することが可能である。

【0063】

本発明において得られた組換えDNAベクター pML48の挿入配列上には、6つの構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをmlcA、mlcB、mlcC、mlcD、mlcE及びmlcRと命名した。このうちmlcA、mlcB、mlcE及びmlcRは配列表の配列番号2に示される塩基配列上にコード領域を有し、mlcC及びmlcDは配列表の配列番号1に示される塩基配列上にコード領域を有しているものと推定された。

【0064】

上述の6つの構造遺伝子に対応するML-236B生合成促進cDNAを取得する方法としては、各構造遺伝子の塩基配列に基づいて設計され得るプライマーを用いたRT-PCRによるクローニング、該塩基配列に基いて得られるDNAプローブを用いたcDNAライブラリーからのクローニング等が挙げられる。ま

た、これらの方法で取得される cDNA を機能発現させるためには、完全長の cDNA を得ることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

RT-PCR による ML-236B 生合成促進 cDNA の取得について述べる。

【 0 0 6 6 】

ML-236B 生合成促進 cDNA を取得するための一組の RT-PCR 用プライマーは、各鋳型鎖と選択的にアニーリングし且つ cDNA を取得するべく設計されなければならないが、この条件を満たす限りにおいて、一組の RT-PCR の一方又は双方は各鋳型鎖の一部と完全に相補的でなくてもよい。センス鎖にアニーリングする RT-PCR 用プライマー（以下、「センスプライマー」という。）としては、センス鎖の一部と完全に相補的なセンスプライマー（以下、「無置換センスプライマー」という）又はセンス鎖の一部と完全には相補的でないセンスプライマー（以下、「一部置換センスプライマー」という。）を使用することができる。アンチセンス鎖にアニーリングする RT-PCR 用プライマー（以下、「アンチセンスプライマー」という。）としては、アンチセンス鎖の一部と完全に相補的なアンチセンスプライマー（以下、「無置換アンチセンスプライマー」という）又はアンチセンス鎖の一部と完全には相補的でないアンチセンスプライマー（以下、「一部置換アンチセンスプライマー」という。）を使用することができる。

【 0 0 6 7 】

センスプライマーは、それを一方のプライマーとする RT-PCR 産物が本来の位置に翻訳開始コドン atg を含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないように設計される（なお、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列及び配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列における、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳開始コドンの位置は、表 4 に記載されている）。

【 0 0 6 8 】

無置換センスプライマーは、cDNAの翻訳開始コドン a t g 中の a 又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする。

【0069】

一部置換センスプライマーは、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列又は配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする（配列表の配列番号 2 の全塩基配列は、配列表の配列番号 1 の全塩基配列に対して完全に相補的である）。

【0070】

また、一部置換センスプライマーが翻訳開始コドン a t g より 3' - 側の塩基配列を含む場合、翻訳開始コドン a t g より 3' - 側の塩基配列上に開始コドン a t g から始まる翻訳フレーム中に終始コドンとなるような塩基配列（t a a、t a g 又は t g a）は含まれない。なお、開始コドン a t g から始まる翻訳フレームとは、翻訳開始コドン a t g より 3' - 側の塩基配列を翻訳開始コドン a t g から 3 塩基単位に分割したときに生じる 3 塩基からなる配列をいう。

【0071】

さらに、一部置換センスプライマーが、翻訳開始コドンの a、a t 又は a t g（「塩基又は塩基配列 m」という。）にその位置で対応する塩基又は塩基配列（「塩基又は塩基配列 m'」という。）を含む場合、塩基又は塩基配列 m が a のとき、塩基又は塩基配列 m' は a であり、且つ、塩基又は塩基配列 m' の a は、その一部置換センスプライマーの 3' - 末端に位置する。塩基又は塩基配列 m が a t のとき、塩基又は塩基配列 m' は a t であり、且つ、塩基又は塩基配列 m' の a t は、その一部置換センスプライマー 4 の 3' - 末端に位置する。塩基又は塩基配列 m が a t g のとき、塩基又は塩基配列 m' は a t g であり、且つ、塩基又は塩基配列 m' の a t g 中の a から 3' - 方向に数えて $3 \times n + 1$ （n は 1 以上の整数）番目のヌクレオチドを 5' - 末端とするトリヌクレオチドがその一部置換センスプライマーに存在する場合、該トリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

【0072】

また、一部置換センスプライマーの3' -末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3' -方向に数えて $3 \times n + 1$ (n は1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、その一部置換センスプライマーを一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを鋳型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを鋳型とするPCR産物において、 $3 \times n + 1$ 番目のヌクレオチド及びその3' -側に隣接するジヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

【0073】

さらに、一部置換センスプライマーのいずれか一つの3' -末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3' -方向に数えて $3 \times n + 2$ (n は1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、その一部置換センスプライマーを一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを鋳型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを鋳型とするPCR産物において、 $3 \times n + 2$ 番目のヌクレオチド及びその3' -側並びに5' -側に隣接する2つのモノヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

【0074】

また、一部置換センスプライマーの3' -末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3' -方向に数えて $3 \times n + 3$ (n は1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、 $3 \times n + 1$ 乃至 $3 \times n + 3$ 番目のヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

【0075】

以上がセンスプライマーの要件である。

【0076】

アンチセンスプライマーは、それ自体及び上述のセンスプライマーを一組のプライマーとして使用するRT-PCRにより、各構造遺伝子 (m l c A、m l c B、m l c C、m l c D、m l c E 及び m l c R) にコードされるペプチドのN末端からC末端までをコードしたcDNAを増幅できるように設計される。

【0077】

無置換アンチセンスプライマーは、cDNA上の翻訳終止領域附近の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーであれば特に限定されないが、好適には翻訳終止コドンの3'-末端の塩基に対して相補的な塩基又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする塩基配列を有し、より好適には翻訳終止コドンに対して相補的な3塩基の配列を有する（なお、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳終止コドン、該翻訳終止コドンの相補配列、各構造遺伝子にコードされるペプチドのC末端のアミノ酸残基、該アミノ酸残基をコードした塩基配列、並びに、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列におけるそれらの位置は、表8乃至10に記載されている）。

【0078】

一部置換アンチセンスプライマーは、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする。

【0079】

以上がアンチセンスプライマーの要件である。

【0080】

また、一部置換センスプライマー及び一部置換アンチセンスプライマーは、上述の要件を満たす限りにおいて、それぞれの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

【0081】

さらに、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの設計は、前述のPCR用プライマーの設計に関する記述に従って行なう。

【0082】

上述の通り、RT-PCRの鋳型には、ML-236B生産菌のmRNA又は全RNAを使用する。本発明においては、pML48挿入配列中に存在する構造遺伝子m1cEのコード領域全域を増幅できるような一組のプライマー（それぞれの塩基配列は、配列表の配列番号35及び36参照）を設計及び合成し、SANK13380の全RNAを鋳型してRT-PCRを行うことにより、構造遺伝子m1cEに対応するML-236B生合成促進cDNAが得られた（以下、「ML-236B生合成促進cDNA（E）」という。）。

【0083】

また、上述の通り、RT-PCR産物を適当なDNAベクターに組込むことにより、該RT-PCR産物をクローニングすることができる。そのようなクローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。RT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit（Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。）が好適に使用される。

【0084】

このようにして取得されるML-236B生合成促進cDNAがML-236B生産菌内で機能発現し得ることは、該cDNAをML-236B生産菌体内での機能発現に適したDNAベクターに組換え、その組換えDNAベクターで細胞を形質転換し、該形質転換細胞及び宿主細胞のML-236B生合成能を比較することにより確認できる。すなわち、ML-236B生合成促進cDNAが形質転換細胞内で機能発現していれば、該形質転換細胞のML-236B生合成能が宿主細胞のそれよりも改善されている。

【0085】

ML-236B生産菌体内での機能発現に適したDNAベクター（以下、「機能発現ベクター」という。）としては、ML-236B生産菌を形質転換することができ、且つML-236B生合成促進cDNAの塩基配列に対応するアミノ

酸配列を有するポリペプチドをML-236B生産菌体内で機能発現させることができ、且つ宿主細胞内で安定に保持され、且つ宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有しているものであれば、特に限定されない。

【0086】

また、機能発現ベクターは、ML-236B生合成促進cDNA(E)を2つ以上含有してもよい。

【0087】

さらに、機能発現ベクターは、ML-236B生合成促進cDNA(E)以外のDNAのうち、ML-236B生産菌に導入されることによりML-236Bの生合成を促進するものを2種以上、それぞれ2つ以上含有してもよい。そのようなDNAとしては、例えば、m1cA、m1cB、m1cC、m1cD又はm1cRに対応するcDNA、ML-236B生合成関連ゲノムDNA又は本発明のML-236B生合成促進cDNAの発現調節因子をコードしたDNA等が挙げられる。

【0088】

また、機能発現ベクターは、宿主細胞に表現型の選択性を付与する塩基配列を有していること、及びシャトルベクターであることが、それぞれ好ましい。

【0089】

さらに、宿主細胞に付与され得る表現型の選択性としては、薬剤耐性等が挙げられ、好適には抗生物質耐性、より好適にはアンピシリン耐性、ハイグロマイシンB耐性である。

【0090】

また、機能発現ベクターがシャトルベクターである場合、一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有し、且つ他方の宿主細胞において挿入配列にコードされたポリペプチドを機能発現させるのに必要な塩基配列を有していなければならない。また、形質転換される複数の微生物群の宿主にそれぞれ異なった表現系の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。複数の微生物群の組み合わせは、本明細書中に記載されたML-236B生合成関連ゲノムDNAのクローニング及び機能発現に使用されるシャトルベクター

の要件に準ずる。本発明においては、このようなシャトルベクターとして、DNAベクター pSAK333（特開平3-262486号公報記載）に、該DNAベクター上に存在するアスペルギルス・ニデュランス由来の3-ホスホグリセレートキナーゼ（3-phosphoglycerate kinase：以下、「pgk」という。）遺伝子プロモータ、外来遺伝子挿入用のアダプター、及び該DNA上に存在するpgkターミネータを、この順で組込むことにより作製されたDNAベクター pSAK700（図4参照）が好適に使用される。

【0091】

上述のような機能発現ベクターに、上述のML-236B生合成促進cDNAを組込むことにより、該cDNAの塩基配列に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをML-236B生産菌体内で機能発現させることができる。本発明においては、ML-236B生合成促進cDNA（E）をpSAK700のアダプター部位に挿入することにより、組換えcDNA発現ベクター、pSAKexpEが得られた。pSAKexpEの挿入配列、すなわちML-236B生合成促進cDNA（E）の塩基配列は、配列表の配列番号37に記載した。

【0092】

なお、pSAKexpEで形質転換された大腸菌株 E. coli pSAKexpE SANK 72499は、平成12年（2000年）1月25日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号）に国際寄託され、受託番号FERM BP-7005を付された。

【0093】

ML-236B生合成促進cDNA、ML-236B生合成関連ゲノムDNA、又はそれらの断片を機能発現させるための形質転換法は、宿主細胞により適宜選択される。好適なML-236B生産菌でペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ペニシリウム・シトリナムの孢子からプロトプラストを調製し、該プロトプラストに組換えDNAベクターを導入することにより行なうことができる（Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載）。

【0094】

ペニシリウム・シトリナムを培養したスラントからPGA寒天培地のプレートへ該菌を接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、該プレートから胞子を回収し、該胞子 1×10^7 乃至 1×10^9 個を50乃至100mlのYPL-20培地（組成；0.1% (w/v) イーストエキストラクト（Difco社製）、0.5% (w/v) ポリペプトン（日本製薬（株）製）、20% (w/v) ラクトース、pH 5.0）に接種し、22乃至28℃、18時間乃至2日間保温する。該培養物から発芽胞子を回収し、細胞壁分解酵素で処理し、プロトプラストを得る。細胞壁分解酵素としては、ペニシリウム・シトリナムの細胞壁を分解するものであり且つ該菌に有害な作用を及ぼさないものであれば特に限定されないが、例えば、ザイモリアーゼ、キチナーゼ等が挙げられる。

【0095】

ML-236B生産菌又はそのプロトプラストに、ML-236B生合成促進cDNAを挿入した組換えDNAベクターを接触させると、該DNAベクターがプロトプラストの中に取り込まれ、形質転換体を得られる。

【0096】

ML-236B生産菌の形質転換体の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができるが、好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換体の場合は、予め形質転換させたプロトプラストを適当な条件下で培養することにより細胞壁を再生させ、その後培養する。すなわち、形質転換されたペニシリウム・シトリナムのプロトプラストを封入したVGS中層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2% (w/v) 寒天）をVGS下層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2.7% (w/v) 寒天）及びVGS上層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、1.5% (w/v) 寒天）で挟み、22乃至28℃、7乃至15日間保温することにより行なうことができる。得られた菌株はPGA培地上で、22乃至28℃で保温しつつ継代培養する。該菌株をPGA培地で作製したスラントに白金耳を用いて接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、0乃至4℃で保存する。

【0097】

上述の通り細胞壁を再生させたペニシリウム・シトリナムの形質転換体を培養したスラントから、MBG3-8培地へ該形質転換体を接種し、22乃至28℃、7乃至12日間、振盪しつつ保温することにより、ML-236Bを効率よく生産することができる。なお、宿主細胞のペニシリウム・シトリナムについても、全く同様の液体培養によりML-236Bを生産させることができる。

【0098】

ML-236B生産菌の形質転換体の培養物からのML-236Bの精製は、通常天然物の精製に使用される諸技法を組み合わせることによりなされる。該諸技法としては、特に限定されないが、例えば、遠心分離、濾過による固液分離、アルカリ又は酸処理、有機溶媒による抽出、転溶、吸着及び分配等の各種クロマトグラフィー、結晶化等が挙げられる。ML-236Bは、ヒドロキシ酸体とラクトン体の両方の形をとり、相互に変換し、更に、ヒドロキシ酸体は安定な塩を形成する。このような物理化学的特質を利用して、ML-236Bのヒドロキシ酸体（以下、「遊離型ヒドロキシ酸」という。）、ML-236Bのヒドロキシ酸塩（以下、「ヒドロキシ酸塩」という。）、又はML-236Bのラクトン体（以下、「ラクトン」という。）を得ることができる。

【0099】

該培養物を、加熱下又は常温下でアルカリ加水分解することにより開環し、ヒドロキシ酸塩に変換し、該反応溶液を酸性にした後濾過し、濾液を水と混和しない有機溶媒で抽出することにより、目的化合物を遊離型ヒドロキシ酸として得ることができる。水と混和しない有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、メチレンクロリド、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、蟻酸エチル、酢酸エチル等のエステル類、それら2種以上の混合溶媒等が挙げられる。

【0100】

また、この遊離型ヒドロキシ酸を、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属塩類の水溶液に転溶することにより、目的化合物をヒドロキシ酸塩として得ることができる。

【0101】

さらに、この遊離型ヒドロキシ酸を、有機溶媒中で加熱して脱水するか、又は他の方法により閉環することにより、目的化合物をラクトンとして得ることができる。

【0102】

このようにして得ることができる遊離型ヒドロキシ酸、ヒドロキシ酸塩及びラクトンは、カラムクロマトグラフィー等により精製、単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーの担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、セファデックス LH-20 (Pharmacia 社製)、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学 (株) 製)、シリカゲル、逆相系担体等が挙げられ、好適には C18 系の担体である。

【0103】

ML-236B の定量法としては、通常有機化合物の定量に用いられる方法であれば特に限定されないが、例えば、逆相高性能クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography: 以下、「逆相 HPLC」という。) 法等が挙げられる。逆相 HPLC 法による定量は、ML-236B 生産菌の培養物をアルカリ加水分解し、可溶性画分を C18 カラムを用いた逆相 HPLC に供し、紫外吸収を測定し、該吸収を定量化することにより行なうことができる。C18 カラムとしては、通常の逆相 HPLC に使用される C18 カラムであれば特に限定されないが、例えば、SSC-ODS-262 (直径 6 mm、長さ 100 mm: センシユー科学 (株) 製) 等が挙げられる。移動相としては、通常逆相 HPLC に使用される溶媒であれば特に限定されないが、例えば、75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸等が挙げられる。移動相に流速 2 ml/分の 75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用いて SSC-ODS-262 カラムに ML-236B を室温で添加すると、4.0 分後に溶出される。ML-236B の検出は、HPLC 用 UV 検出器を用いて行なうことができ、UV 検出器の吸収波長は、220 乃至 280 nm であり、好適には 220 乃至 260 nm、より好適には 236 nm であ

る。

【0104】

なお、本明細書においては、アデニンを「a」、グアニンを「g」、チミンを「t」、シトシンを「c」とそれぞれ記載する。配列表の各配列番号に示される塩基配列は、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン（特許庁公表、平成10年6月）」に従って記載した。

【0105】

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0106】

実施例1. pSAKcos1ベクターの作製

1) 大腸菌由来のハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子 (hygromycin B phosphotransferase gene: 以下、「HPT」という。) を含有するプラスミド pSAK333 (特開平3-262486号公報記載) を制限酵素 BamHI (宝酒造(株)製) で消化し、T4DNAポリメラーゼ (宝酒造(株)製) で末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造(株)製) を用いて上記DNA断片を自己環状化し、大腸菌のコンピーテント・セル JM109株 (宝酒造(株)製) を形質転換した。形質転換大腸菌から BamHI 部位を欠失したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドを pSAK360 と命名した。

3) pSAK360 を制限酵素 Pvu2 で消化した後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、5'末端の脱リン酸化を行なった。コスミドベクター pWE15 (STRATAGENE社製) からコス(cos)部位を含む [Sal1-Sca1] 断片 (約3kb) を取得し、T4DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後、pSAK360のPvu2部位に連結し、JM109株を形質転換した。該形質転換大腸菌から [Sal1-Sca1] 断片 (約3kb) を Pvu2

部位に挿入したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドを pSAKcos1 と命名した。pSAKcos1 は、pWE15 由来の BamH1、EcoR1 及び Not1 の各制限酵素認識部位を 1 つずつ有する。また、pSAKcos1 は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAKcos1 又は外来 DNA を挿入した pSAKcos1 による形質転換体の選択は、40 μ g/ml のアンピシリン (Ampicillin: Sigma 社製) を培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380 を宿主とする場合、pSAKcos1 又は外来 DNA を挿入した pSAKcos1 による形質転換体の選択は、200 μ g/ml のハイグロマシシン B (hygromycin B: Sigma 社製) を培地に添加して行なった。

【0107】

pSAKcos1 の構築手順を図 1 に記載した。

実施例 2. ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株のゲノム DNA の調製

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の培養

ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の種菌の培養は PGA 寒天培地を用いたスラントにて行なった。すなわち、ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株を白金耳により接種し、26℃にて14日間保温した。このスラントは4℃で保存した。

【0108】

本培養は、液体通気培養にて行なった。上述のスラント 5 mm 角の菌体を 50 ml の MBG3-8 培地を入れた 500 ml 容の三角フラスコに接種し、26℃、210 rpm の条件下で 5 日間振盪培養した。

2) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の培養物からのゲノム DNA の調製

1) の培養物を、室温、1000×G の条件下で 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。湿重量 3 g の菌体を、ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉末になるま

で破碎した。菌体破碎物を20mlの62.5mM EDTA・2Na（和光純薬（株）製）-5%（w/v）SDS-50mM Tris（和光純薬（株）製）-塩酸（和光純薬（株）製）緩衝液（pH8.0）で満たした遠心管に入れ、穏やかに混合した後、0℃にて1時間静置した。10mM Tris-塩酸-0.1mM EDTA・2Na（pH8.0：以下「TE」という。）で飽和した10mlのフェノールを添加し、50℃にて1時間穏やかに攪拌した。室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した後、15mlの上層（水相）を別の遠心管にとり、0.5倍容のTE飽和フェノール及び0.5倍容のクロロホルム溶液を加え、2分間穏やかに攪拌した後、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した（以下、「フェノール・クロロホルム抽出」という。）。10mlの上層（水相）に10mlの8M 酢酸アンモニウム（pH7.5）及び25mlの2-プロパノール（和光純薬（株）製）を添加し、-80℃にて15分間冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した。沈澱を5mlのTEに溶解させた後、20μlの10mg/mlリボヌクレアーゼA（Sigma社製）及び250単位のリボヌクレアーゼT1（GIBCO社製）を添加し、37℃にて20分間保温した。これに20mlの2-プロパノールを添加し、穏やかに混合した後、糸状のゲノムDNAをパスツールピペットの先端に巻きつけ、1mlのTEに溶解させた。このDNA溶液に0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム（pH6.5）及び2.5倍容のエタノールを加え、-80℃にて15分冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で5分間遠心分離した（以下、「エタノール沈澱」という。）。得られた沈澱を200μlのTEに溶解し、ゲノムDNA画分とした。

実施例3. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーの作製

1) ゲノムDNA断片の調製

実施例2において得られたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA（50μg）を含む100μlの水溶液に、0.25単位のSau3A1（宝酒造（株）製）を添加した後、10、30、60、90及び120

秒経過後に20 μ l ずつサンプリングし、各サンプルに20 μ l ずつの0.5M EDTA (pH 8.0) を加えて制限酵素反応を停止した。アガロースゲル電気泳動により、得られた部分消化DNA断片を分離し、30 kb以上の大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。

【0109】

回収したゲルを細かく砕き、ウルトラフリーC3遠心式ろ過ユニット（日本ミリポア（株）製）に入れた。-80℃にて15分間冷却し、ゲルを凍結した後、37℃にて10分間保温してゲルを融解した。5000×G、5分間遠心分離し、DNA抽出液を得た。このDNA抽出液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

2) DNAベクター pSAKcos1の前処理

pSAKcos1を制限酵素BamH1（宝酒造（株）社製）により消化した後、65℃にて30分間アルカリフォスファターゼ（宝酒造（株）製）反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

3) ライゲーション及びin vitroパッケージング

上記1) 記載のゲノムDNA断片（2 μ g）及び上記2) 記載の前処理済みpSAKcos1（1 μ g）を混合し、DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用い、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を5 μ lのTEに溶解させた。ライゲーション生成物溶液を、GIGAPAK II Gold（STRATAGENE社製）キットを用いたin vitroパッケージングに供し、組換えDNAベクターを含む形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌のコロニーを形成させたプレートに3 mlのLB培地を注ぎ、セルスクレーパーを用いてプレート上のコロニーを回収した（回収液1という）。さらに3 mlのLB培地でプレートを洗浄、回収した（回収液2という。）。回収液1及び2の混合液にグリセリンを終濃度18%となるよう加えたものを大腸菌菌体液と称し、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNAライブラリーとして、-80℃にて保存した。

実施例 4. ペニシリウム・シトリナム SANK 1 3 3 8 0 株のゲノム DNA を
鋳型とした PCR による PKS 遺伝子断片の増幅

1) PCR 用プライマーの設計及び合成

アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) の PKS 遺伝子のアミノ
酸配列 (Brown, D.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載) に基
づき、配列表の配列番号 3 及び 4 に示されるミックス・プライマーを設計及び合
成した。該合成はホスフォロアミダイト法により行った。

【0 1 1 0】

配列表の配列番号 3 : gayacngcntgyasttc

配列表の配列番号 4 : tcncnknrcwgtgncc

なお、配列表の配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列において、n はイノシンの
塩基 (ヒポキサンチン) を、y は t 又は c を、s は g 又は c を、k は g 又は t を、r は g
又は a を、w は a 又は t を、それぞれ表わす。

2) PCR による DNA 断片の増幅

上記 2) 記載の PCR 用プライマー (各 1 0 0 p m o l)、実施例 2 で得られ
たペニシリウム・シトリナム SANK 1 3 3 8 0 株のゲノム DNA (5 0 0 n
g)、0. 2 mM d A T P、0. 2 mM d C T P、0. 2 mM d G T P、
0. 2 mM d T T P、5 0 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム及
び 1. 2 5 単位の Ex. T a q DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) を含む
5 0 μ l の反応液を、9 4 ° C にて 1 分間、5 8 ° C にて 2 分間、7 0 ° C にて 3 分間
、の連続する 3 工程からなるサイクル反応に供した。このサイクルを 3 0 回繰り
返すことにより DNA 断片を増幅した。PCR は、T a K a R a PCR Th
e r m a l C y c l e r M P T P 3 0 0 0 (宝酒造 (株) 製) を使用して
行なった。

【0 1 1 1】

増幅された DNA 断片を、アガロースゲル電気泳動に供した後、約 1. 0 乃至
2. 0 k b の大きさをもつ DNA 断片を含むアガロースゲルを回収した。ゲルか
ら DNA を回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない

、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

3) ライゲーション及び形質転換

2) で得られたDNA断片、及び、TAクローニング・システムpCR2.1 (Invitrogen社製) を用いて、このキットに含まれるプラスミドpCR2.1にライゲーションし、形質転換株を得た。

【0112】

得られたクローンを数個選び、マニアティスら (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) の方法に従って培養した。すなわち、2 ml のLB培地を含む24 ml 容の試験管に各コロニーを接種し、37℃にて18時間、振盪培養した。

【0113】

この培養物からの組換えDNAベクターの調製は、アルカリ法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) に従った。すなわち、1.5 ml の培養液を、室温、10000×Gの条件下で2分間遠心分離し、沈澱より菌体を回収した。菌体に100 μl の50 mM グルコース-25 mM Tris-塩酸-10 mM EDTA (pH 8.0) を加えて懸濁し、200 μl の0.2 規定水酸化ナトリウム-1% (w/v) SDSを加えて穏やかに攪拌し、溶菌させた。これに150 μl の3M 酢酸カリウム-11.5% (w/v) 氷酢酸を加えてタンパク質を変性させ、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離し、上清を回収した。上清について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を40 μg/ml のリボヌクレアーゼA (Sigma社製) を含有する50 μl のTEに溶解させた。

【0114】

各組換えDNAベクターを制限酵素消化して電気泳動に供し、電気泳動パターンの異なる組換えDNAベクター中の挿入塩基配列を、DNAシーケンサー (モデル377: パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて決定した。

【0115】

その結果、P K S 遺伝子断片を含む組換えDNAベクターを保有する株の存在が確認された。

【0 1 1 6】

実施例 5. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノミック・サザンブロットハイブリダイゼーション

1) 電気泳動及びメンブレンへのトランスファー

実施例 2 において得られたのペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (10 μ g) を、制限酵素EcoRI、SalI、Hind3又はSacI (いずれも宝造(株)製) を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルの調製には、Agarose L03「TAKARA」(宝酒造(株)製) を用いた。泳動後、ゲルを0.25規定塩酸(和光純薬(株)製) に浸し、室温にて10分間穏やかに振盪した。このゲルを0.4規定水酸化ナトリウム(和光純薬(株)製) 中に移し、室温にて30分間穏やかに振盪した。マニアティスらのアルカリトランスファー法(Maniatis,T.,et al.,Molecular cloning,a laboratory manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)記載) により、ゲル中のDNAをナイロン・メンブレンHybondTM-N+ (アマシャム社製) にトランスファーし、固定した。メンブレンを2 \times SSC (1 \times SSCの組成は、150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム) で洗浄した後風乾した。

2) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

1) で得られたメンブレンに対し、実施例 4 で得られたP K S 遺伝子断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行なった。

【0 1 1 7】

プローブには、実施例 4 において得られたP K S 遺伝子断片DNA (1 μ g) をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

【0 1 1 8】

ハイブリダイゼーション液 (DIGイーザーハイブ: ベーリンガー・マンハイ

ム社製)に1)記載のメンブレンを浸し、20rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、マルチシェーカー・オーブンHB(TAITEC社製)を用い、20rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた55℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

【0119】

洗浄したメンブランをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids(ベーリンガー・マンハイム社製)で処理し、X線フィルム(ルミフィルム:ベーリンガー・マンハイム社製)に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A(Fuji Film社製)を用いて行なった。

【0120】

その結果、実施例4において得られたPKS遺伝子断片はペニシリウム・シトリナムのゲノム上に存在することが確認された。

【0121】

実施例6. PKS遺伝子断片をプローブとしたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

PKS遺伝子を含むゲノムDNAのクローニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行なった。

1) メンブレンの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーとして保存した大腸菌菌体液(実施例3記載)を、LB寒天培地のプレートに、プレート1枚あたり5000乃至10000個のコロニーが生育するよう希釈して撒いた。このプレートを26℃にて18時間保温した後、4℃にて1時間冷却した。Hybond TM-N⁺(アマシャム社製)をプレートにのせ、1分間接触させた。コロニーを付着させたメンブレンをプレートから注意深く離し、コ

ロニー接触面を上にして、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5規定水酸化ナトリウムに7分、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5M Tris-塩酸-1mM EDTA (pH 7.5) に3分ずつ2回浸した後、400mlの2×SSCで洗浄した。洗浄したメンブレンを30分風乾した。

2) ハイブリダイゼーション

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1 μg) をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

【0122】

ハイブリダイゼーション液 (DIGイーザーハイブ: ベーリンガー・マンハイム社製) に1) 記載のメンブレンを浸し、20rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に加え、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製) を使い、20rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた68℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

【0123】

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製) で処理し、X線フィルム (ルミフィルム: ベーリンガー・マンハイム社製) に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A: Fuji Film社製) を用いて行なった。

【0124】

以上、1) 及び2) 記載の操作をスクリーニングという。

【0125】

一回目のスクリーニングで陽性シグナルが検出されたクローンのコロニー周辺をかきとってLB培地に懸濁した後、適宜希釈してプレートに撒いて培養し、同様に二回目のスクリーニングを行ない、陽性クローンを純化した。

【 0 1 2 6 】

なお、本実施例で得られた陽性クローン、すなわち形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199は、平成11年（1999年）7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号）に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。

【 0 1 2 7 】

実施例7．組換えDNAベクターpML48の挿入配列の解析（1）

実施例6で得られた*E. coli* pML48 SANK71199株の培養及び該培養物からの組換えDNAベクターの調製は、実施例4記載の方法に準じて行なった。

【 0 1 2 8 】

得られた組換えDNAベクターをpML48と命名した。pML48挿入配列を各種制限酵素消化し、pUC119（宝酒造（株）製）に組込むことにより、サブクロニングした。得られたサブクローンをプローブとして、実施例5記載の方法に準じてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行なった。すなわち、pML48の各種制限酵素消化物を電気泳動に供し、DNAをメンブレンへトランスファーしたのに対して、ハイブリダイゼーションを行なった。

【 0 1 2 9 】

その結果、pML48挿入配列の制限酵素地図が作成された。

【 0 1 3 0 】

また、上述の各サブクローンの挿入配列の塩基配列を、DNAシーケンサーモデル377（パーキンエルマー・ジャパン社製）を用いて決定し、pML48の全塩基配列を決定した。

【 0 1 3 1 】

pML48の挿入配列は全34203塩基であった。

【 0 1 3 2 】

pML48の挿入配列の塩基配列は、配列表の配列番号1及び2に記載されて

いる。配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

【0133】

該挿入配列上の構造遺伝子の存在について、遺伝子検索プログラム GRAIL (ApoCom GRAIL Toolkit: APOCOM社製) 及び相同性検索プログラム BLAST (Gapped-BLAST (BLAST2): WISCONSIN GCG package ver. 10.0 に搭載) を用いて解析した。

【0134】

その結果、pML48 の挿入塩基配列中には、6 種類の異なる構造遺伝子の存在が推定され、それぞれを m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE 及び m1cR と命名した。また、m1cA、m1cB、m1cE 及び m1cR は配列表の配列番号 2 記載の塩基配列中に、m1cC 及び m1cD は配列表の配列番号 1 に示される塩基配列中に、それぞれコード領域を有していることが推定された。さらに、該挿入配列における各推定構造遺伝子の相対的位置及び大きさが推定された。

【0135】

本実施例の結果を図 2 に記載した。

実施例 8. 組換え DNA ベクター pML48 の挿入配列の解析 (2)

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法及び RACE により、実施例 7 において存在が示唆された構造遺伝子の発現解析、及び 5' - 末端並びに 3' - 末端領域の解析を行なった。

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 の全 RNA の調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株を培養したスラント (実施例 2 記載) より 5 mm 角の菌体を 10 ml の MGB3-8 培地を入れた 100 ml 容の三角フラスコに接種し、26℃にて 3 日間、振盪培養した。

【0136】

培養物からの全 RNA の調製は、グアニジン・イソチシアネート法を利用し

たRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製) を用いて行った。すなわち、培養物を、室温、 $5000\times G$ の条件下で10分間遠心分離して菌体を回収し、湿重量2gの菌体を液体窒素により凍結した後、乳鉢上で粉末になるまで破碎した。この破碎物をグアニジン・イソチオシアネートを含む4mlの菌体溶解バッファー (このキットに含まれる。) に懸濁した。懸濁液をこのキットに含まれるQIAshredder スピンカラム10本に $450\mu l$ ずつ分注し、室温、 $1000\times G$ 、10分間遠心分離した後、溶出液をそれぞれ回収した: 各溶出液に 225μ ずつのエタノールを加えた後、このキットに含まれるRNAミニスピンカラムに添加した。このカラムをこのキットに含まれる洗浄用緩衝液で洗浄した後、 $50\mu l$ ずつのリボヌクレアーゼ・フリー蒸留水で吸着物を溶出させ、溶出液を全RNA画分とした。

2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

$20\mu g$ のペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAを含む $2.25\mu l$ の水溶液に、 $1\mu l$ の $10\times MOPS$ (組成; $200mM$ 3-モルフォリノプロパンスルホン酸、 $50mM$ 酢酸ナトリウム、 $10mM$ EDTA $\cdot 2Na$ 、 $pH7.0$: $121^{\circ}C$ にて20分間オートクレーブ滅菌してから使用した。: 同仁化学研究所 (株) 製)、 $1.75\mu l$ のホルムアルデヒド及び $5\mu l$ のホルムアミドを添加して混合し、RNAサンプルとした。このRNAサンプルを、 $65^{\circ}C$ にて10分間保温した後、氷水中で急冷し、アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動のゲルは、 $10ml$ の $10\times MOPS$ 及び1gのAgarose L03「TAKARA」 (宝酒造 (株) 製) を $72ml$ のピロカルボニック・アシッド・ジエチルエステル (Sigma社製) 処理水に混合し、加熱してアガロースを溶解させた後冷却させ、 $18ml$ のホルムアルデヒドを添加することにより作製した。サンプルバッファーは、 $1\times MOPS$ ($10\times MOPS$ を水で10倍希釈したもの。) を使用した。ゲル中のRNAを、 $10\times SSC$ 中でHybondTM-N⁺ (アマシャム社) ヘトランスファーした。

【0137】

プローブには、pML48挿入配列を下記表1記載の制限酵素1及び2で消化することにより得られるDNA断片 (a、b、c、d及びe) を用いた。

【0138】

【表1】

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションのプロープ

プロ ープ	制限 酵素1	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*	制限 酵素2	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*
a	EcoRI	6319～6324	EcoRI	15799～15804
b	BamHI	16793～16798	PstI	18164～18169
c	KpnI	26025～26030	BamHI	27413～27418
d	SalI	28691～28696	SalI	29551～29556
e	HindIII	33050～33055	SacI	34039～34044

*各ヌクレオチド番号は、配列表の配列番号1に基づく。

プローブの標識、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、実施例5のサザンブロット・ハイブリダイゼーションに従って行なった。

【0139】

本実施例の結果を図3に記載した。

【0140】

各シグナルは各プローブの塩基配列と相同な転写産物の存在を示す。

【0141】

本実施例で pML48 挿入配列上に存在が推定された6つの構造遺伝子のうち、mlcB、mlcD、mlcE及びmlcRはペニシリウム・シトリナム SANK13380株内で転写されていることが確認され、mlcA及びmlcCについても該細胞内で転写されていることが示唆された。

【0142】

各シグナルの位置は、転写産物の相対的なサイズを示すものではない。

3) 5' RACEによる5' -末端配列の決定

各構造遺伝子の5' -末端領域を含むcDNAの取得は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA

ends, Version 2.0 (GIBCO社製) を用いて行なった。

【0143】

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり且つ該遺伝子の5'-末端近傍に位置すると考えられる塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNAを2種類作製した。

【0144】

表2に、各構造遺伝子の、より3'-側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA(1)の塩基配列を、表3に、より5'-側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA(2)の塩基配列を、それぞれ記載した。

【0145】

【表2】

5' RACEによる5'-末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA(1)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 5 : gcatgttcaatttgctctc
mlcB	配列番号 6 : ctggatcagaacttttctgc
mlcC	配列番号 7 : gtcgcagtagcatgggcc
mlcD	配列番号 8 : gtcagagtgatgctcttctc
mlcE	配列番号 9 : gttgagaggattgtgagggc
mlcR	配列番号 10 : ttgcttggttgattgtc

【0146】

【表3】

5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA (2)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号11：catggtactctcgcccggttc
mlcB	配列番号12：ctccccagtaagtaagctc
mlcC	配列番号13：ccataatgagtgtgactgttc
mlcD	配列番号14：gaacatctgcacccccgtc
mlcE	配列番号15：ggaaggcaaagaaagtgtac
mlcR	配列番号16：agattcattgctgttgcatc

オリゴヌクレオチドDNA (1) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の全RNAを鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。すなわち、1 μ gの全RNA、2.5 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (1)、1 μ lのSUPER SCRIPT™ II reverse transcriptase (このキットに含まれる。)を含む24 μ lの反応液を、16℃にて1時間保温した後、生成物をこのキットに含まれるGLASSMAXスピナートリッジに添加してcDNA第一鎖を精製した。

【0147】

cDNA第一鎖の3' -末端に、このキットに含まれるterminal deoxyribonucleotidyl transferaseによりポリC鎖を付加させた。

【0148】

3' -末端にポリC鎖の付加したcDNA第一鎖、40 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (2) 及び40 pmolのAbridged Anchor Primer (このキットに含まれる) を含む50 μ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて

18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてPCR2.1を用いてクローニングした。

【0149】

以上の操作を5' RACEという。

【0150】

5' -末端を含むcDNA断片の塩基配列を決定し、転写開始点及び翻訳開始コドンの位置を推定した。

【0151】

5' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する5' -末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表4に表示した。また、表5に、各構造遺伝子の転写開始点及び翻訳開始の存在する配列番号、転写開始点の位置及び翻訳開始点の位置を記載した。

【0152】

【表4】

各5' -末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号 17
mlcB	配列番号 18
mlcC	配列番号 19
mlcD	配列番号 20
mlcE	配列番号 21
mlcR	配列番号 22

【0153】

【表5】

各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始コドンの位置

遺伝子 番号	翻訳開始コドンの 存在する配列番号*	配列番号1又は2におけるヌクレオチド	
		転写開始点	翻訳開始コドン
mlcA	配列番号2	2 2 9 1 3	2 3 0 4 5 ~ 2 3 0 4 7
mlcB	配列番号2	1 1 6 8 9	1 1 7 4 8 ~ 1 1 7 5 0
mlcC	配列番号1	1 1 6 4 1	1 1 7 9 6 ~ 1 1 7 9 8
mlcD	配列番号1	2 4 0 6 6	2 4 3 2 1 ~ 2 4 3 2 3
mlcE	配列番号2	3 3 9 9	3 5 4 5 ~ 3 5 4 7
mlcR	配列番号2	3 6 5	4 0 0 ~ 4 0 2

* 配列表の配列番号1及び2に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

4) 3' RACEによる3' -末端配列の決定

各構造遺伝子の3' -末端領域を含むcDNAの取得は、Ready To Go: T-Primed First-Strand kit (ファルマシア社製) を用いて行なった。

【0154】

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入塩基配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり、構造遺伝子の3' -末端近傍に位置すると考えられるセンス側のオリゴヌクレオチドDNA (3) を1種類ずつを作製した。

【0155】

表6に各構造遺伝子について作製したオリゴヌクレオチドDNA (3) の塩基配列を表示した。

【0156】

【表6】

3' RACEによる3'-末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA (3)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号23：atcataccatcttcaacaac
mlcB	配列番号24：gctagaataggttacaagcc
mlcC	配列番号25：acattgccaggcaccagac
mlcD	配列番号26：caacgccaagctgccaatc
mlcE	配列番号27：gtcttttctactatctacc
mlcR	配列番号28：ctttcccagctgctactatc

オリゴヌクレオチドDNA (3) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の全RNA (1 μ g) を鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。

【0157】

cDNA第一鎖、40 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (3) 及びNot I-d (T) 18プライマー (このキットに含まれる。) を含む100 μ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてPCR2.1を用いてクローニングした。

【0158】

以上の操作を3' RACEという。

【0159】

得られたcDNAの3'-側断片の塩基配列を決定し、翻訳終止コドンの位置を推定した。

【0160】

3' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する3' -末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表7にまとめた。また、表8に、各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該コドンの位置を配列表の配列番号1又は2に基づいて記載した。

【0161】

【表7】

各3' -末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号29
mlcB	配列番号30
mlcC	配列番号31
mlcD	配列番号32
mlcE	配列番号33
mlcR	配列番号34

【0162】

【表8】

各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該翻訳終止コドンの位置

遺伝子	翻訳終止 コドン	翻訳終止コドンの 存在する配列番号*	配列番号1又は2における 翻訳終止コドンのヌクレオ チド番号
mlcA	tag	配列番号2	32723～32725
mlcB	taa	配列番号2	19840～19842
mlcC	taa	配列番号1	13479～13481
mlcD	tga	配列番号1	27890～27892
mlcE	tga	配列番号2	5730～5732
mlcR	tag	配列番号2	1915～1917

* 配列表の配列番号1及び2に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、各構造遺伝子がコードすると推定されるポリペプチドのC末端のアミノ酸残基、そのアミノ酸残基をコードするトリヌクレオチドの塩基配列及びそのトリヌクレオチドの位置を表9に記載した。

【0163】

【表 9】

各構造遺伝子のコードするポリペプチドの C 末端アミノ酸

遺 伝 子	C 末端 アミノ 酸残基	該アミノ酸をコー ドするトリヌクレ オチドの塩基配列	該トリヌクレ オチドの存在 する配列番号 *	配列番号 1 又は 2 にお ける該トリヌクレオチ ドのヌクレオチド番号
mlcA	アラニン	gcc	配列番号 2	3 2 7 2 0 ~ 3 2 7 2 2
mlcB	セリン	agt	配列番号 2	1 9 8 3 7 ~ 1 9 8 3 9
mlcC	システイン	tgc	配列番号 1	1 3 4 7 6 ~ 1 3 4 7 8
mlcD	アルギニン	cgc	配列番号 1	2 7 8 8 7 ~ 2 7 8 8 9
mlcE	アラニン	gct	配列番号 2	5 7 2 7 ~ 5 7 2 9
mlcR	アラニン	gct	配列番号 2	1 9 1 2 ~ 1 9 1 4

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、表 8 記載の翻訳終止コドンに対する相補配列、該相補配列の存在する配列番号、及び、該相補配列の位置を表 10 にまとめた。

【0164】

【表 10】

各構造遺伝子の翻訳終始コドンに対する相補配列

遺伝子	翻訳終始コドン に対する相補配 列	該相補配列の存在 する配列番号 *	配列番号 1 又は 2 におけ る該相補配列のヌクレオ チド番号
mlcA	cta	配列番号 1	1 4 7 9 ~ 1 4 8 1
mlcB	tta	配列番号 1	1 4 3 6 2 ~ 1 4 3 6 4
mlcC	tta	配列番号 2	2 0 7 2 3 ~ 2 0 7 2 5
mlcD	tca	配列番号 2	6 3 1 2 ~ 6 3 1 4
mlcE	tca	配列番号 1	2 8 4 7 2 ~ 2 8 4 7 4
mlcR	cta	配列番号 1	3 2 2 8 7 ~ 3 2 2 8 9

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

以上の通り、各構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。これらの情報に基いて、各構造遺伝子の転写産物及び翻訳産物を取得することが可能である。

実施例 9. 構造遺伝子 *m l c E* に対応する *ML-236B* 生合成促進 *cDNA* の取得

1) 全 RNA の調製

ペニシリウム・シトリナムの全 RNA は実施例 8 の方法に従って調製した。

2) プライマーの設計

実施例 8 により決定された構造遺伝子 *m l c E* に対応する完全長の *cDNA* を取得するために、*m l c E* の 5' - 上流域のヌクレオチド配列よりセンス・プライマー (5'-gttaacatgtcagaacctctaccccc-3' : 配列表の配列番号 35 番参照) を、3' - 下流域のヌクレオチド配列よりアンチセンス・プライマー (5'-aatatttcaagcatcagtctcaggcac-3' : 配列表の配列番号 36 番参照) を、それぞれ設計及び合成した。該合成はホスフォロアミダイト法により行った。

3) RT-PCR

m l c E の遺伝子産物をコードする完全長の *cDNA* を取得するために、Takara RNA LA PCR kit (AMV) Ver. 1.1 を用いた。

【0165】

1 μ g の全 RNA、キットに添付の Random 9mers プライマーを 2.5 pmol、1 μ l の逆転写酵素 (キットに含まれる。) を含む 20 μ l の反応液を 42℃ にて 30 分保温し、*cDNA* 第 1 鎖を合成した後、99℃ にて 5 分間加熱して逆転写酵素を失活させた。

【0166】

cDNA 第 1 鎖反応溶液全量、40 pmol のセンス・プライマー及び 40 pmol のアンチセンス・プライマーを含む総容 100 μ l の反応液を、94℃ にて 2 分間保温し、続いて、94℃ にて 30 秒、60℃ にて 30 秒、及び、72℃ にて 2 分間を 1 サイクルとする反応を 30 回行なった後、72℃ にて 5 分間、4℃ にて 18 時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、

ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製した。つづいて、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いて、大腸菌のコンピーテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換し、形質転換大腸菌から該DNA断片を所有したプラスミドを保持する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpCRexpEと命名した。

【0167】

得られた組換えDNAベクターpCRexpE中の挿入DNAの塩基配列を決定したところ、該挿入DNAは構造遺伝子m1cEに対応する完全長のcDNAを含んでいた。以下、該挿入DNAを単に「cDNA」と言い、その塩基配列及びその塩基配列から推定されるペプチドのアミノ酸配列は、配列表の配列番号37に記載されている。

実施例10. 発現ベクターpSAK700の構築

実施例1記載のベクターpSAK333及びpSAK360を用いて、cDNA発現ベクターpSAK700の構築を行なった。

1) pSAK333を制限酵素BamH1とHind3（宝酒造（株）製）で二重消化し、アガロースゲル電気泳動後、4.1kb断片をゲルより回収し、T4DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）で該DNA断片の末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用いて上記DNA断片に、EcoRI-NotI-BamH1アダプター（宝酒造（株）製）を連結し、大腸菌のコンピーテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。形質転換大腸菌からアダプターを所有したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK410と命名した。

3) pSAK360を制限酵素Pvu2及びSsp1で二重消化した後、電気泳動を行ない、アスペルギルス・ニデウランス由来の3-ホスホグリセレートキナーゼ（3-phosphoglycerate kinase: 以下、「pgk」という。）遺伝子のプロモーター及びターミネーター、大腸菌由来のHPTを含有するDNA断片（約2.9kb）をゲルより回収した。

4) 回収した上記DNA断片を、pSAK410のPvu2部位に、DNA 1

igation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用いて連結し、大腸菌のコンピテント・セル JM109 株 (宝酒造 (株) 製) を形質転換した。形質転換大腸菌から該 DNA 断片を所有したプラスミドを保持する株を選抜し、この株が保有するプラスミドを pSAK700 と命名した。

【0168】

pSAK700 の構築手順を図 4 に記載する。

【0169】

pSAK700 は、アダプター由来の BamHI 及び NotI の各制限酵素認識部位を 1 つずつ有する。また、pSAK700 は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin resistant gene: 以下、「Amp^r」という。) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子である HTP を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAK700 又は外来 DNA を挿入した pSAK700 による形質転換体の選択は、40 μ g/ml のアンピシリンを培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380 を宿主とする場合、pSAK700 又は外来 DNA を挿入した pSAK700 による形質転換体の選択は、200 μ g/ml のハイグロマシシン B を培地に添加して行なった。

【0170】

実施例 11. cDNA 発現ベクター pSAKexpE の構築

1) 実施例 9 で得られた組換え DNA ベクター pCRe x pE を制限酵素 HpaI 及び SspI (ともに、宝酒造 (株) 製) の存在下で 37℃ にて 2 時間反応させ、該反応物をアガロースゲル電気泳動に供し、ml cE の完全長 cDNA を含む 1.7 kb 付近のバンドをゲルより回収した。

2) pSAK700 を制限酵素 BamHI (宝酒造 (株) 製) で 37℃ 1 時間反応させた後、T4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) で該 DNA 断片の末端を平滑化した。pSAK700 の平滑化末端に、1) により得られた 1.7 kb の DNA 断片を DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用いて連結し、大腸菌のコンピテント・セル JM109 株 (宝酒造 (株)

製)を形質転換した。その結果、cDNA発現ベクターで形質転換された大腸菌株が得られた。

【0171】

本実施例で得られた形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpE SANK 72499は、平成12年(2000年)1月25日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-7005を付与された。

実施例12. ML-236B生産菌の形質転換

1) プロトプラストの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラントより、白金耳を用いてPGA寒天培地に接種し、26℃にて14日間保温した。該培養物よりペニシリウム・シトリナム SANK13380株の胞子を回収し、 1×10^8 個の胞子を80mlのYPL-20培地に接種し、26℃にて1日間保温した。胞子の発芽を顕微鏡観察により確認した後、発芽胞子を、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して胞子を沈澱として回収した。胞子を滅菌水で3回洗浄した後、プロトプラスト化を行なった。すなわち、200mgのザイモリアーゼ20T(生化学工業(株)製)及び100mgのキチナーゼ(Sigma社製)を10mlの0.55M 塩化マグネシウムに溶解し、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して得られた上清を酵素液とし、20mlの酵素液及び湿重量0.5gの発芽胞子を100ml容三角フラスコに入れ、30℃にて60分間穏やかに振盪し、発芽胞子がプロトプラスト化したことを顕微鏡観察により確認した後、反応液を3G-2ガラスフィルター(HARIO社製)で濾過した。該濾液を、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離し、プロトプラストを沈澱として回収した。

2) 形質転換

1) で得られたプロトプラストを30mlの0.55M 塩化マグネシウム溶液で2回、30mlの0.55M 塩化マグネシウム-50mM 塩化カルシウム-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸(pH6.3:以下、「M

CM溶液」という。)で1回それぞれ洗浄し、 $100\mu\text{l}$ の4%(w/v)ポリエチレングリコール8000-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸-0.0025%(w/v)ヘパリン(Sigma社製)-50mM 塩化マグネシウム(pH6.3:以下、「形質転換用溶液」という。)に懸濁した。約 5×10^7 個のプロトプラストを含む $96\mu\text{l}$ の形質転換溶液及び $120\mu\text{g}$ のpSAKexpEを含む $10\mu\text{l}$ のTEを混合し、氷上で30分間静置した。これに1.2mlの20%(w/v)ポリエチレングリコール-50mM 塩化マグネシウム-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸(pH6.3)を加えて穏やかにピペッティングし、室温、20分間静置した。これに10mlのMCM溶液を加えて穏やかに混合し、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離した。沈澱より形質転換プロトプラストを回収した。

3) 形質転換プロトプラストにおける細胞壁の再生

2)で得られた形質転換プロトプラストを5mlの液状のVGS中層寒天培地に懸濁し、固化した10mlのVGS下層寒天培地プレートに重層した。該プレートを、26℃にて1日間培養した後、プレート1枚につき5mgのハイグロマイシンB(Hygroscopicin B:Sigma社製)を含む10mlの液状のVGS上層寒天培地を重層した(ハイグロマイシンBの終濃度は $200\mu\text{g}/\text{ml}$)。26℃にて14日間保温して得られた菌株を、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシンBを含有するPGA寒天培地上で継代培養した後、PGA寒天培地で作製したスラントに植え継ぎ、26℃にて14日間保温した。

【0172】

該スラントは4℃で保存した。

試験例1. 形質転換株及び親株の有するML-236B生合成能の比較

実施例12において得られた形質転換株及び親株ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養し、該培養物中のML-236B量を測定した。

【0173】

形質転換株を培養した実施例12記載のスラント又はペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養した実施例2記載のスラントより、5mm角の

菌体を、10mlのMBG3-8培地を入れた100ml容の三角フラスコに接種し、26℃にて2日間、振盪培養した後、3.5mlの50%(w/v)グリセリン溶液を添加し、さらに26℃にて10日間、振盪培養した。

【0174】

該培養物10mlに50mlの0.2規定水酸化ナトリウムを加え、26℃にて1時間、振盪しつつ保温した後、室温、3000×Gの条件下で2分間遠心分離し、1mlの上清を回収し、9mlの50%メタノールと混合してHPLCに供した。

【0175】

HPLCのカラムには、SSC-ODS-262（直径6mm、長さ100mm：センシュウ科学（株）製）を用い、移動相には75%(v/v)メタノール-0.1%(v/v)トリエチルアミン-0.1%(v/v)酢酸を用い、室温にて2ml/分の流速で溶出した。これら条件下において、ML-236Bはカラム添加後4.0分に溶出された。検出はUV検出器の吸収波長を236nmに設定して行なった。

【0176】

形質転換株のうち、ML-236B生合成能の上昇した株3つが得られた。これらのML-236B生合成能は親株より平均10%高かった。これら3株のML-236B生合成能は、モノスポア処理等の継代を行なった後も安定に維持された。

【0177】

【発明の効果】

本発明においてML-236B生産菌より得られたML-236B生合成促進cDNAは、ML-236B菌体内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進する。

【図面の簡単な説明】

【図1】大腸菌及び糸状菌に導入させることができ且つ長いDNAを挿入することができるDNAベクターpSAKcos1の構築図。

【図2】pML48挿入配列の構造遺伝子解析。

【図 3】 pML48 挿入配列のノーザンブロット・ハイブリダイゼーション。

【図 4】 大腸菌及び糸状菌に導入させることができる cDNA 発現ベクター pSAK700 の構築図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> The cDNA (E) which enhances the biosynthesis of ML-236B in ML-236B
-producing organisms.

<130> 2000044SW

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 1

gatcaatact acgtcgttgt tatttccttg tcagtaatga ctaacaaatt ccccagaaca 60
gacgaagtca cagctcacac cacaagagaa aatgagtcca gcgaggatta cagatttctc 120
gccaggcaaa ccgagaaaag ctctcttatg catccacggt gccgggtgct cagcagccat 180
attccgcgtc cagatctcta aactgcgcgt ggcgttgaaa aacgagtttg aattcgtata 240
tgcgaccgcg ccgtttagct ccagccccgg acccggcgtg cttcctgtct tccaaggcat 300

ggggccatac tacacctggt tccaaaagca tcatgacgcc gttacaaaca cgacaacccc 360
 caggtgggc gatagagtag cggctgtgat cgggcctgtg caaaagaccg tccaagattg 420
 gtctataact aaccacagc caccattgt cggcatagtg gccttctctg agggcgcatt 480
 ggctgccact ttgctgctcc atcaacagca aatgggaaaa ctgccatggt ttccgaaaat 540
 gagcattgct gttttgattt gctgtttcta tagcgatgaa gccagagatt acatgagagc 600
 cgaggcgcaa gacgacgacg acaagctaata atcaacgtg ccgacactgc atcttcacgg 660
 tcgtcaagat tttgctctcc aagggtcgag acagatgggt gaaacacatt acctgcctca 720
 gaatgcagat gtactcgagt ttcagggaaa gcataatttt cccaacagac cgagtgatgt 780
 ccaggagacg gtcaagcgct tccaacagct atatcaaaag gtcaagatgt caggttcatt 840
 tgtctagggt agacaacagg gtatatagca aggctctggc tctcatgcct agtccatacc 900
 acatttttac tgaacaaatt tgaatagttc taatcttaca cggtttgaat gtcaccttc 960
 caagggtgat ttagttatag tggctcgac catctcataa atatttcgtg aacatatttt 1020
 ggatagatca tggaaggctc gttctgaaca ggcatgacag acatctaaaa cactcgatc 1080
 accacaacaa ggcactaac cagtaactat ggaactattt gcaatggcgt cgaatttata 1140
 tacaggatgg attgaaatca attccaagcc ttggagggtt caccttcctc acagagtctt 1200
 tcgaaacgcg ctaccgaggt atatttatca ccgttacggt actctgaacc gcgctatcta 1260
 acttgatgtt acgattgctg caataaagaa gagcaacgaa ggtagaagta atttgacaa 1320
 agatacaaga cgaattcgct atttgtagat gaatatgcgt gtgtcaattg acgccgaatt 1380
 caggatagat ttgccatctg ctctattgcc aatttctaata ccatctttat catgaacaac 1440
 actcaaacca cacatctgaa ttcacggcgc tgaacgatct aggccaactt cagagccggg 1500
 ttcacgaga acatagtgag gattgaagaa aagtgggtcta caaaggcctg agcgtgctca 1560
 gggccataca gcgagctctg aagtttgaca tgaatgagtg ggtccttggt agggatcatc 1620
 cacatctcga gaacgatgtc ataaggagtg cgctcacggg aagcgagAAC actcgtcatt 1680
 ttggcattgc caattgagcc actctccgct tgaccctgct tgtaatcaaa gacagcctgg 1740
 aacaaggggg cgtgtgtctg agtcttgggt tcctcgcttg aggtaggag attcaggcct 1800
 agacagtcga ggatgacgcc atacggcacc cgcgctgtgt gcatggcctc acgcacactg 1860
 tccttggtgg ctacaaggtg ctgcccgaat gtcttgtctc cgacgaactc atcaaagcgc 1920
 aggggaagca cgttagcga aaagcccatc gccgaaattt ctccatggt ggatcggttg 1980
 gtttcggcga ggccgatggt tatgtctttg ctgccggtta gacgcgcaa caaaacgtgg 2040

taggcggcca ggtagaactg catgggggtt gccttgtgct tgcggctccg ctctttgatt 2100
 cggaaggcga ccatgggata taaacgagca attgcttcat actgctgcca cgtgaatggc 2160
 tgtatttgct gctgctctga attggcagca gggctcattga tcagattcat gatgggaagc 2220
 acggttggcg cagatgacga gactttgcta tgcattggact tccagaacgc gatatcgctc 2280
 cccattcgcc cattttccag gttttcccg tgttgacgg ctagatcaga gaattgggtc 2340
 gatggctgct gcattttcac cccgctgtaa atctgcccga tctcattgaa caggttttct 2400
 gttgttgagc catcaccaac taatctgtgg tagccgatta ccaacagggtg gtcattctgtg 2460
 ccccagtaga aatcaacgag tctgagagtg tcacctgtgg agatgctata gtttgtcttc 2520
 tcgagtttcc ggtactcttc ctctgcctcc gcagcgttgt tcacctgaac aaagtgcact 2580
 ctgttctccg ggttcttgag aaccacttgg acgggacat ttaaactcgt gctatagtca 2640
 tcgccagtaa caaagcacgt acggaagatc tcgtgacggc gcaatgaggc tttcagagcc 2700
 cgctcaacc ggtcgaggtc aatggtagcc ttcattgaaca tgccaatagt gttgttgaag 2760
 atggtagat cttttacat ttgttgctgc ctccaggaat actcctggcc aagggacaac 2820
 ctctcgcgac gaagaatctt acggcctccc tgctcattat cgctctcttg ctcttcattc 2880
 tcttcggctg acgacgcatc tgtgctggta gcagagcttg cttcatcatg gctgtctgtt 2940
 ggtgtcggag aagccccgt gtccgagggt cccgtggaat caccaatttg caacagcagc 3000
 ggaatggatg tagctgggag tcgggtggcc gcgtcgtcgg caagatcagc gacagaagca 3060
 ccgccaagta ccctcaagag tgggaggtca aggtagagtt gctttgagaa ccatgagccg 3120
 acagtcactg cacccaagga gtcgacacct tgatcaatga gaggaatggt tgggtccacg 3180
 ctctccccgt ccgaaacttg gagggtaaca cggagtttct cagatagacc atctgcaact 3240
 ttgttagttt gaactcgata tcaggaaacg catgagagat aacttaccaa tcacgatttg 3300
 ccgaacttgg tctaaagtgt ttgcttggtt gagctggctg gcaatggagc ctttagaccc 3360
 tgatccattg tcgccaccgt ctccgcgttg accgggaatt ttgaagtctc cgaaacgagg 3420
 gtcgttgaag taaataattc gatcttgaag cgcagggtca agatctggga taccgtggt 3480
 aagctcaagg tccgcatgt caatgaccgt cttgcgctgt ggttgctgcc gggcacgctg 3540
 gtcagacacg accgcttcgg cgaaaagcgt gtgcagctca tgctcttcaa ctgagtcaaa 3600
 catgaaacgg atagcatcaa agtcctctc catctcggcc ctctgacaa accctacacc 3660
 gtaaacggca ccaatatcga tggttgatcc ctgtggttgt gcgttagtaa cttgacgtcg 3720
 atgcatgata attcaggggt agaaaatacc gccaatctc tggcgcaccg ttgctgggcc 3780

agagcctgta ggtaggcatt cgcagcgcca tagttggact ggccaggatt gccaaataact 3840
 gcaacaatgg acgaaaacat gatgaagaag tcgagcgcct tgctgcccgt ctgttcggag 3900
 aaccgttcat gaagaatgcg tgctccttgt accttgggct tcaacaccat gtccatcatc 3960
 tgggtggtcca tgttcttcag catgacatcc tgcagcacca aaggcccgaa cgcgatgccg 4020
 gcaacagggtg gcaacttcat atcgacaagc ttgccaaggc cagcatcgac tgaatcctca 4080
 ttggcaacat ccctaaagaa agtaattgga taagtaaacg aggatgtggt agcaagggtgt 4140
 gatgtgatat caatcaactt acattgacag aacgggtgatg tcaccaccaa gtgcctccat 4200
 gttggcgatc catttgggat caagtcgagg gttccggcta gtgagcacia catggcgggc 4260
 gccatgcaag atcatccagc gacagagaga gcgaccaagg tccccggtaa gaccaacaag 4320
 caaatacgtc ttcttgttgg aaaataagtt accagagtcg atggggcaaa tcctagcgga 4380
 cacctcattt tccttccagt cgatgacggt ggccagattg aagcgttggt cattgtggtt 4440
 gacagagagc tgaccaggca agagaatttg tgtggctgta ataactttct cagtgtcgtc 4500
 gacagtcgac gcagagacgg tattttttgc cattgccaca gagtgtcga ggattggaat 4560
 atcctcaaca tgactaactt tgtatgtgga agctgtactt cggataagat agtcaccact 4620
 gtacatgaag caactgggtg gtagcaactt ggccaaacgg ttggttatcc cggcagcagt 4680
 ccggtcggta gacaagtcaa agaatgccat catgtttgtc ggcaggctgt gtttcagccg 4740
 agcgtcgggt tccttggcat gtaatcggat ccaaggagcc ggaatagttt tgacgtcga 4800
 cagagttggt gccaaatgaa cctgaacacc gtaggttttg gccgactcca gaattgcttt 4860
 gacgcagaag attgggggct ccataatcag aattgatgca tcagagccaa aggactgagc 4920
 gctagagaga attgtttcgg caaggagggc tgcagctgtg gacaacaaga aggaactatc 4980
 ctcgccttcc gccatgttat cgggcagact atgcatgtag tttctcggtta catgcagtat 5040
 agatccattc ttctcagcca gggcgactac aggcacctca catgtattct ccagaatact 5100
 gccctgcacg acatggaagt atccgagatg gccacgcga attgcctggg gaagagcgta 5160
 gcgaacacga acagttgctt ttccagcatg acgagcgtct tctaacgaat cacacgtctc 5220
 ggttgactca agatagtaca tcgatgagga tgctccctc gcctctttca gtgcaatggc 5280
 cgtcttggac gaattaaagt taccgaaaat tggacgacga gacgagtcca tacggtcgtt 5340
 cctagcaata tcctgttca aacgagggac ccaggcacga cccttgcacc agtacacttc 5400
 gggctcatga gtccatgtta ttgattccaa aagctgatca tcgctctcct cgaagcgcaa 5460
 aagttgctca acgaagaatt tgggtgtctag gttctccaca gtatcgacat cgaagacgtg 5520

cggtcccaag tcagggttct cgagcttgat tgtcctcaac attccgatgg tgctggcctg 5580
 gtggggatga tcaatccagg cattctctgt cagccacatc atgcgtccgg cgtagaagag 5640
 aagagacttg actgcctcaa acttgtcctc ttcaagggtg caaaacactt catcatcaag 5700
 ttccgagagg atgacaaaag tcgacttagg ctgcaaggcc gggtcgtcga gaacactttc 5760
 cagccgcttg acggagtgga tgtgtctatg cggtagggca gctttcatgt cgttcaaaat 5820
 gcgttcggtt tttgtcgatt cgccaccgat aaccactaat ggcgggtatg agtccttcaa 5880
 tggagcagaa agtggatcat acaaacgctc aacgggtggca tccacagcat gtgtactgaa 5940
 gacagacggg atcaaatcat cctctcgatc aagtgtccga ctatcgacgc cagagaaccc 6000
 aactctcttg agggatatgt cccattggtc aacggacccc gaggcactca aagcacgagt 6060
 ttctgtcttct ccagtccatc gatcagcgaa aagcccagag atgaaggcga ggcgagcagg 6120
 ctgcgcatgg gtgacccga aagtaaccaa gtgaccaccc ggcttgagca aggaccttat 6180
 gtgagccaat ttttctcga agttggagct ggcatggagg acatcggatg caataatcag 6240
 atcgtaggag tgaggcttga atccttgctc tgctgggctt ctgttgatgt ctagtgcctc 6300
 aaactgcatg agaccgtcga attcggaaag ttgttcacgg gccttgccaa taacatccgc 6360
 cgagatgtca gtgcaagtgt aactgttgaa accaagtiga ggtgatgcaa gaacgcgctt 6420
 cgtggcgatg cctgtaccca agcctaataa gcgaacgaca gattagcaaa ctgcctagtt 6480
 acttacattt cagattcgac ttaccgatct caaggatata aatggattgg tagcgatgag 6540
 caatttggct aaccagatcc tgaacgacgt gtattgctga gccaaaggcg agcttgttgg 6600
 tatagtactc ggtgaacaac ccacgcgggt tcatgatata caaaggatcc ccgttcccgc 6660
 gaacaattga aattaattct ttgcctaccc tttggatcag gcgcacatgt ggggtgggacg 6720
 agttgcttca agtaaaagggt taatataaaa gaatgaaaaa acacggaaca gctttgggtg 6780
 tacctttcac acatttgctc aatgtgaaca gaagtgtcct cctcccaaga ctctgtgtac 6840
 cactgatggg ggccagcccg agcatcggcc tgaacctggg cacaccattc aatgtacttc 6900
 tgggaatgga ggtcggcatt ttgacggctg tcgggggtta tctgggctag gaaggatttg 6960
 atgtagaagt aaacgattcg ctcgatgggc agaatgtcct ccttgtcccg agctatgata 7020
 aacgtcgcag ggtcctccag cagtttttcg ggcgtgaggg gtccccagac ccactttgcg 7080
 aagattcggg ggtcggctga agcagtcggg ggagagaaaag gcttaaagac aatgttatca 7140
 acttggaata gcgttgtctt ggtcgaatcg tacaccgtga tgtcgccgct caggaaatca 7200
 cccttgtcgt gtgtgttgat tgtgtcaaac gcaagctcgg tttcaccaga attaccgcc 7260

gatatacaga gcgatggaat cagagtcact ctgtcaacgt gagtaggcac gtacaatgag 7320
cgtaggcgac gatctcctgg agaggaatac gctccaatga cagtctggaa cgcgatgtcc 7380
aggggcgctg ggtggagcaa gaggggctca ttgcgcaatt catccttaag tggaaggaaa 7440
gccaaaggtgc cgctagcttt ggagtcggcc cttctcatgg tctgcaaacg acggaagtct 7500
ttgctgtagt cataccaag gaggtcaagt tcccgataga agaaatcgat gttgacattg 7560
ttcatctggg ggtactcttc ctgaggtggc ggcaaaagct gcgatgacgg tgatgcctcg 7620
ccaagggtta tgacgatttg gcctttggcg gatgtcgaaa gtcactctc ctttgccaga 7680
caggaatcaa taacaaattt gaccgtgact tggccatccg catcattgtc actggtgact 7740
tcggctgtca agttcagctc cacggagggtg ttttcatctt caaacacgat ggctttgttg 7800
atgctcatgt ccaagatttc caggagctga acttgggcgg cacgctcacc agccaccttc 7860
atggcagctt ccatggccat aattatgtac ccagcagcgg ggaacacagt ctggccttgt 7920
agcgcattgac cgtcgagcca ttccagatcc cggggcctga tgaagtttgt ccactggaag 7980
gtcgatgctg tgctgtaaga agaaagcttt ccaagcagaa gatggggcgc acctccacga 8040
agatgctggc gggtaggagcg agattctgcc cagtattgac gagtatgatc ccaagagtat 8100
gtgggcaatg actttgacag gttttgaacg gcacgatcgg gccggacttg ttgtacgaag 8160
ccctcggcgt cgatactccg aactccgaaa cgctcccaa tgtatcccag acctccagca 8220
aaagcgtcca catcgtcaac gtttcgtgcc aagcaccggt tatacggcag ctccacaccg 8280
gcaagagcat ccttgatggt ggctagacac ggacccttga gagcagggtg ggcgccaatt 8340
tcgatggcga cgtcgattag acgatgagtg atgactgctt tctgcacagc ctgcgagaac 8400
aagaccggag agacgagatt gtctttccaa taagcgggca tcacatcctg tacagtcatt 8460
tgcttgctgg tctcgtggac ggcagagaac caagcaacac tategttacc ttggccatcg 8520
gcaacagcac agtcgcactc cagcaatgcc ttgacatatg gagctgcgca tgggtgcatg 8580
tgatgcgaat ggtaggcctt gtcaactctc aagattctgg caaaagtga ttcatcctcc 8640
aagacacctt caacgtgctg gatagcatcc atgtcgccgg agaaggtcac actatccggt 8700
gaattgctag cggcgacgca gacccgaccc tcaaaggctt cgagctcgca tagttccttt 8760
gcgtcatcgt acgacatacc tgccgctagc atagcgccgt tctggccgct tggagaagag 8820
gcatgctccg cggacacaac tccacgcaga tgcgcaatac ggatagcttg agtggcactg 8880
atgaatcctg ccgcaaaggc acaggcaatc tcacctgaac tgtggccgac aattgcactg 8940
aactcgatac cagctgcagc gagaagtcgg accagaacga tttgtacggc gcagcataga 9000

ggctgggaga agctggcgag tctgacgttt gaggcattccc ctccaagcat gagctgggtca 9060
 tacagtgtcc acgtaggccg atacttttca ggcagtgttt gcagtgaatt atccagctct 9120
 tcgagaatgc ctctcacaaa tggcataccc accatgagct tcttcagcat gcccggccac 9180
 tgtgcacctt ggccagtaaa gacacctagt acgcgagggt tgtcattcgc gtcggtgcgg 9240
 aagtcggtga cgacctcacc gtccgcgatg gcagcctcca gtgccgcgcg ggctacttcc 9300
 ttgttgtgtg ctgcaatcgc acgacggaag ggcaagatag accgtttctc aagtaaggta 9360
 tatgcgatat catgcatgtc cacgtcatca tgcgtttcca gaaattggag catattttct 9420
 agcgttgcct tcatggagcg ctgcgacttc gatgaaagca caaggggcaa gctgcatgca 9480
 tctgcatctg aggtcacctc tgttaccact gctgtcggct tgtgtggagg agccatatac 9540
 tcttcgataa tagcatgggc atttgtacca ccaaactctg atgtgtttat atgtttagct 9600
 aacttcactt tcgttctcaa gaagtgcagt tgaatcctta ccaaataaat taacgctgac 9660
 tctgcgaggc tgcccgggcg caacaatcgg ccattctgtg gcctccgttg caattttcaa 9720
 gtgcgtatag aacggagcga cacggggact gatcttctca aacagcaggt ttggcgggat 9780
 cacgccattt cgtacagcaa acgatgcctt cattaagccc gcaataccag cagtgccttc 9840
 cgtgtgaccg agaactgtct tgatgtgcc gacaaaaagc tcattttct cgcgctcgt 9900
 gtcgattgtt ccatccttgt gtccgaagaa ggctgttgca atagcctcag ctccctgtgg 9960
 gtcaccggct ggtgtaccag ttccctgggat ctctgtgta gggagagaga gactttctgc 10020
 aacttcata aggtgatac ttccaggga taccattac catgggcttc aaagaactgg 10080
 cagcgttcct ggggggttgt aatatcaaga ccagccttg catatgtggc ccgaatgagg 10140
 gcttcttgtg cgctatggtt tggcattgtg atacctgtc ttcggccatc ttggttgata 10200
 ccggtctctc ggataacaca ctcgatactg tccccgtcgc gcagtgcctg gtcagcgtt 10260
 ttccaggacaa tagagcaaac accttcctaa aaagcagtta caggaggtca gtgccatctt 10320
 gctttttttg aaaggaattg atgcattgtc aacttactcc tctggcatat ccatcggcag 10380
 cagcatccca cattcgagat ctaccattgg gggacagcat gttcaatttg ctctccatta 10440
 caaaggatcat ggggccaat atcagattcg caccggctgc aaccgccatg gtactctcgc 10500
 ccgttctaag ctgttgacg gccagatgca cggcagctaa ggatgaacta caggctgtgt 10560
 cgatcgtcat ctgcagaatc agtcaggaat ctgtcagcac ttgacgaagt cgggctcgt 10620
 caatgagtgg cactcacact cggcccatgc cagtcgaaga agtatgatac acggttgag 10680
 gccacactga cagctacccc cgtggcagag tatgtaggaa tactatccaa ttcacgcgtc 10740

acgatagtct catagtcatg cgtcatcata ccgacgtaca cagcagtaga ggatccttga 10800
 aggcccttga tccgtaggcc tgcgttggat acagcttcat agaccgtctc cagcagcagc 10860
 ctttgctgtg ggtcaatcgt ttcggcctct ccagcttga tgttgaagaa agaggcatca 10920
 aaaccgcgta gatcctcctg cagcaagtat gcaaagggtg cgttcgtgcg cccgggggtga 10980
 gtgccatcgg ggctgtaaaa tgtatcgacg tcaaattctct ccttagggat cttggctctgt 11040
 acatcccggg gctctttgag cagctcccaa agttttgatg gtgtgttgac accacctgga 11100
 aaccgacaac cgcttccac taccacaatt ggctcgtttg gatagttggc ttgatccata 11160
 actgctgata ctgtttttgg gcgataggat tgggattaaa ccttgtcttg cgtcagtaga 11220
 tcttctcact gcatgccggg cacaacattt gttcttacag aatcgagag ttgaatctct 11280
 gagcgaacaa gccggccttg caaccgatac cgtcgttata ttacttgca cgtatcagta 11340
 ctcatctaga ttcggacaat ttcaagatcc attctagtac tcaaatgccc ccacttccca 11400
 gcaatgcaag ctcggcacct agcaaaccct cccggcgctca ttcggtgcac gaatagccat 11460
 tcctccatac ggcgttattc ggtcacacga ggctgaatga atcaaacgtg aatatcaatt 11520
 ggctgtatca aggtgaaacc gagtttttca ctcggtattgt tcttgtgctg ctcggtgaag 11580
 ctgctcctaa aggaaacaac cgaactgccc catccaggta aacttcgatt gggggggggg 11640
 tttttttttt ttcaaggttg actggaagag tgctctcggc caaaaaatcc cagaagcatt 11700
 agtgctgtta ttcgattata aaccgtcgca gcgctctcat tcttcgctct tcttctttt 11760
 ccactgggtg gcataggctc tatctgtctc acgcaatgct cggccagggt cttctgaccg 11820
 tcgaatcgta ccaatgggta tcgacccctc aagcccttgt ggcggtcgca gtgcttctta 11880
 gtctcatcgc ctaccgtttg cggggggcgcc agtccgaact gcaagtctat aatcccaaaa 11940
 aatgggtggga gttgacgacc atgagggtga ggcaggactt cgatacgtat ggtccgagct 12000
 ggatcgaagc ttggttctcg aaaaacgaca agcccttgcg cttcattgtt gattccggct 12060
 attgcacat cctcccatcg tccatggccg acgagtttcg gaaaatcaaa gatagtgcga 12120
 tgtacaagtt tttggcggat gtatgacctc tgaattttcc attgttgtaa ctcaatgacg 12180
 tctctaagat tctgatgaat gtataggact ttcaactctca tctccctgga ttcgacgggt 12240
 tcaaggaaat ctgccaggat gcacatcttg tcaacaaagt tgttttgaac cagttacaaa 12300
 cccaagcccc caagtacaca aagccattgg ctaccttggc cgacgctact attgccaagt 12360
 tgttcggtaa aagcgagggt aagtgtcaat ttttctgtct tgagcattga gcctctggct 12420
 gacataccgc gaatatacta gagtggcaaa ccgcacctgt ctattccaat ggattggacc 12480

ttgtcacacg aacagtcaca ctcatatgg tcggcgacaa aatctgccac aatgaggagt 12540
 ggctggatat tgcaaagaac catgccgtga gtgtggcggt acaagctcgc caacttcgcg 12600
 tatggcccat gctactgcga ccgctcgtc actggtttca accgcaagga cgcaaattgc 12660
 gtgaccaagt gcgccgcga cgaaagatca ttgatcctga gattcagcga cgacgtgctg 12720
 aaaaggccgc atgtgtagcg aagggcgtgc agccgcccc a gtacgtcgat accatgcaat 12780
 ggtttgaaga caccgccgac ggccgctggt acgatgtggc ggggtgctcag ctcgctatgg 12840
 atttcgccg catctacgcc tcgacggatc ttttcgtcgg tgcccttgtg gacattgcca 12900
 ggcacccaga ccttattcag cctctccgcc aagagatccg cactgtaatc ggagaagggg 12960
 gctggacgcc tgcctctctg ttcaagctga agctcctcga cagctgcatg aaagagacgc 13020
 agcgaatcaa gccggtcgag tgcgccacta tgcgcagtac cgctctcaga gacatcactc 13080
 tatccaatgg cctcttcatt cccaagggcg agttggccgc tgtggctgca gaccgcatga 13140
 acaaccctga tgtgtgggaa aaccccgaaa attatgatcc ctaccgattt atgcgcatgc 13200
 gcgaggatcc agacaaggcc ttcaccgctc aattggagaa taccaacggt gatcacatcg 13260
 gcttcggctg gaaccacgc gcttgtcccg ggcggttctt cgcctcgaag gaaatcaaga 13320
 ttctcctcgc tcatatactg attcagtatg atgtgaagcc tgtaccagga gacgatgaca 13380
 aatactaccg tcacgtttt agcgttcgta tgcattcaac cacaaagctc atggtacgcc 13440
 ggcgcaacga ggacatcccg ctccctcatg accggtgcta agatataaca cgcaaactaa 13500
 aacaaatatg catccgtccc caggcttatt ccaatagttt ccgtcccaga gaaactaggt 13560
 gctgtattag tcgagtaggt tagtaaaata aaacgcattt tattcgattg tgatgccttc 13620
 tttgtaatcg aacgtggtgt agactttggc tatgtgcgag agacagaaac acagagagag 13680
 agaagggaga gagtgtgtat tcctgctacg cagagcggcc atctgcttct ataccgccag 13740
 ctacaccgcc acgtagggaa gtcggcagta atgaagctt tctcccggta caatcaccca 13800
 tctcccatt ctctcaggcg ttgactggcg cttacgatga cgagggtta ggctctgtta 13860
 agtcttgatg ttcctactca acatccccga ctaggcgaaa gagaggacgg cgcaacgacg 13920
 tggacacaag tactccctcc cgccttcga ctacatatcc acaatctgta ccactgccc 13980
 gtgccaacgc ctttcgaccg ttcaacgcgc atttacaagg cttgcgggaa tcataatgga 14040
 gaaaaaaga gagaactttt gacagtcaag cctccgaggt gctaagacag cttccctggt 14100
 agtataaaaa gcattcactc ttccgacttc gagaacgagt gcacatgtgt actttgttgc 14160
 ttctcagggc cactgtaatg gtatttcagg tatctctatt tactgctatc cagaagtcag 14220

gcattaaata gtcaggctca gcccaggctc gattcagatt ggattcaggc ttcagaccat 14280
ggccgctatg ctcttcgta ctatacctcc gtcgagctat acccgcttgg ccagacaaaa 14340
ggcttcactg aacccttcaa cttaactgca tttcgccaca actaactcga cgaggccggc 14400
gatggtgta ccattcatga gctcaaagat cgacacatca acatggattt cagatgtgat 14460
ccagtttcga agttcaatgg cgacgagtga gtctacgccg acacctgcca ggtttttgga 14520
cgaggacatg tcgtcttctg ccagacaaaa cattcgcatc agcttttccg tcattgcttt 14580
gaggacgata gaaatggcct cgtcgtgaga ggtgaccctg cttagtggg cccgcacgcc 14640
atctggctct tttttatgcg aagagacaaa ggattggctt gcatgaagga cttggcggta 14700
tttaagtcct acaaaccgct gttcctgtat ccagtttgcc tcggtccagt gagcaccggg 14760
ggatgtgttg attcctgtaa ccacagctgc gggaggtgat ggaaattgag gggaagaaca 14820
caggattgcc ttctccaaca catccatgac gtccttttca tgcataggct tgtaacctat 14880
tctagcgagc cggtcggcca caccacggcc agtttcagcc acgtatccaa cagacttgac 14940
catgcccagg tcaatgggtga cagccggcat gccatgggct ctccggtggg gcgcaagtgc 15000
gtcctggaat gcaccagcag ctgcgtaatt ggcctggcct gccccaccca tgaccccaac 15060
aagggatgag agcatcacga agaagtcaac atcctgtgcg atcttgtgaa gataccaact 15120
accctgtact tttgggcgtg ttgctgcatt aaattcatcc aatgtcattc gcgatagaag 15180
cgcgctcctg agaaccatgg caccttgtat gatacctcga attggcgggtg catgtgcttc 15240
ttcgacaaac cggagcacct tggtagacctg atcttgatct gagatgtcac atgcgtgtag 15300
atagacagcg cactgttgat tttgcaagct gggtatgaat ggactggcct ttgcacttct 15360
cgataggata atcaagtgtc tcgcgccatg atcaacaagc cactgacaga tctgctttcc 15420
aattcccccc agcccaccag caactaggta agaactgtca ggcttcagct tcagcgagaa 15480
ccctccatcg ccgactggga ccagttcgtc cccagataca ttgaccacaa ctttgccaac 15540
atgctgacca ctctgcacg tacggaaggc cttctcgatg tttgacaagg agtgctgctg 15600
gattggacca atcaagccaa tcgcttttgt ctcgaggagt tttgtgacat ggttcaacgc 15660
ttcggatact tcttcacttt tggctctttg ccacgagaga agatcaattg atgtgaaaga 15720
gacgtcccg gtagatggca gcatgtcaag tctgctgttt tgctccaggc cttttttcc 15780
aatctcaaca aatctgccga attcggccat gcagtcaaag cttgcttgga ggagttgacc 15840
tgccaatgag tttagaacga catgaacgcc aagtccgccc gtgtaggctt tgatgccgctc 15900
gacgaataag tcattcctgc tcgagaagat atgatccgga ttgatgccga atttatcgcc 15960

gacaaaagtca cgcttggctt gagttcccg cgtgacgaag acctcggcac ccgcaagctg 16020
 ggacaaaatg atcgctgctt gaccgacgcc tccagctcca ctgtggatca agactctttc 16080
 gcctcgtcgt agctttgccg tgggtataaag cgcaatatat gcggtagtga aagccagggg 16140
 gaccgaagcg gcttctggga agcccatctt gtccggaata cggacgacat tagtgtacgg 16200
 cgtctgtgtt ctggtcgccc aatggccttt cagtagtgca catacgcggt cccctaattct 16260
 gaggccttgg ctacgggcag cagctccacc gagctttgtg atcactccgg cgcattcgaa 16320
 gcccatcaca cggttggcct ccaattgacc catggcaacc atgacatccc gaaaattgag 16380
 accgaaagct ttgggttcga tttctacca atcatccgga agatccttgc cttcacgtcc 16440
 ttgctcgtct cgaaattgca gggagtctaa gagccctggc gtctcaacct ccatccgcag 16500
 acgacgcccc ggttgctcga acggctgcag tgtgacctca accgcttctt ggtccttcca 16560
 gtgcgggtca ttgaaaagtc gcggtacgtg gatgacgccg tttctctctg caaattcaaa 16620
 ctcttgtct tcgaaaggt cgccgaggcg gccattgaag atattgcaga tagcatacag 16680
 ggactcgtgg gtgtatgcgt ttcgagaagg atcgagatcc aacgatacat attccttccc 16740
 gttattttcg ttgcggatgg tacgcagcag accaatatgt agagctttcc atggatcctc 16800
 ggagctcatg gctgctcctc tagacacca gagaagtgcg ttgcagttat tcagcatcgc 16860
 ggtgatggat ttgaaggtct cgcttccac ctctccaagg agcgaggact ccatttcccc 16920
 aagaaaaatg catgtccttc cagtggatc tacctcgccc agagcgttga tcgatgggct 16980
 agaactggtc tttcacaaa ttgctgcctg gagactttcc agccaagatg aaggaggtcg 17040
 gagcgctccg tgcagcaaaa gcacctcga ttctgccact gtatccgggg ttgtattctc 17100
 tttctagcc gtcgatagca ttgtgctgat catgtaaac tcatcgtctt cacaatcacg 17160
 aacctccaat tccacaccgt tgaaacgct cgtgtccaac atggtgttcc aaagatcgg 17220
 agtgagcgat ggcgtcgact tccgtcagg ctctcactg agccaccaac ctggcaacag 17280
 tccgaaggta aagaacaaat cgagctgac cctggtagtc tcaacaaaaa tcaagttgcc 17340
 cccaggcttg agcaattttc gaacgttact cagtgttctt ttcatgcac gagttgcatg 17400
 caggacctgg caagccacga ccacatcgta ggtggcacat tcaaaccctt gttgctcggg 17460
 atcgctttca atatccaatt ttttgaaagt catcacgtct tgccaatccg caaattgctc 17520
 acgcgccgac tcgaaaaacc cggcagacac atcggtgaag tcataacgat cgatcggtt 17580
 ggtgtttccc aatgcattga caataagctt tgtgcagccg cccgtgcctc cgccaatctc 17640
 caaaatgcga gaacgcgggt tcttgtgggc gcaaagtcgg atcagctcgc tggcttgtgc 17700

gtttgatcgg ctccatttga ttgcgttgac gtagtatctg cttagcagct gatcttgcac 17760
 catcaactca agtggctctg tticgcggcg tagcattgct attaaactgag gtcctagacg 17820
 agaaatcatc tcgccattga cgctttctcc agcgactctg gcctgtaggc atttcttctg 17880
 ctcagcatcg tcacttagcc agtcgcaact ggctgggctg agcttgtttt gtctcgcaag 17940
 gtccaattgg acattcatcc aatcgaaata cttctgaagg tggccatcca gatgttggat 18000
 atcagaattt gtcaaactcag tgacagcctc ctgtataaag ttgatcgtgc atcttcggag 18060
 gtccatcatg agttccgttt ctttcgtctc agcctcagtg ctcaactttt ctttgagcca 18120
 agtggagtc cccaagctga tgtcaggggc ccaaaccag gagctgcagg cattttctgt 18180
 gtcgttggag tctgactttt ggtcagagaa gctgcttcca accgactgga aaacaaggcc 18240
 ttcaatctct atgactggga ttccgtccga gggagaagaa ccgctatcat agtcatcaaa 18300
 cactgccaaag tcggtagaga aggattgaga gttgcgatcc ttgatgctgg cctgtgcgtc 18360
 cagagcatca ccagcctcca agtcagccag gctagaggat attttgacat ttcttagcct 18420
 ccttgggtacc atggccgttt tcatacgtgt tcccgcgtag ggtaacaccg tgtatgccgc 18480
 ctggatcacc gagtccagag tagtaggatg gacgatgtgt cgattctcgt acgagtgagg 18540
 catagccgag gcagtgtcag caatggaaaa tctgcaaac gagccctgtc cattgttttg 18600
 aattcgctga atgttctgaa aaatgggtcc gtggcatatc ccattcgcgt gtaaggactc 18660
 ccagagatcg ttgggatcaa tgctccggtt atctgagcct agattcaacc tgcgtgaggc 18720
 ttccacagtt gaacagtcaa ggtggcttct ttcgctctcc gaacgtatta atccggtgca 18780
 gtgttctgtc caggtattat tticgcccga aattgagtgc acagaaaatt gatgccagtt 18840
 ctttgtgccg agggaccttt cctcacatga acggatcgtt aggcgcaggt caacctctgc 18900
 ttctgcatca gcgggtatta tgagagcctg cgcgagttca acgtcacgca agttgtagtt 18960
 gatgctagcc cccgcaactg gtgggcagac ttgtgaaaac ccctcgatgg ccatgctgat 19020
 gaagccagct cccggaaaga tgatgctcga accaaccagc tgatctcgta tccatggaat 19080
 atctgacaga cggagaacat gtttccattt aggcgcgaaa tgaggagaga gagattcccg 19140
 tgagcctatc aaagtgtgag gcggatgggt tctctgtttg gactcacgac tgccgcgagg 19200
 ctctctccaa taacgggttt ggtgattcca cgggtacgcc ggcaaatcgc tcagtacctt 19260
 cactctgggc tcttttcttc catgaggaaa gtttatagcg tccattttga gcccataacc 19320
 cttgcttata aactccgtag cagcacgata cattgtctcc aacgagcttc tgccgcgaga 19380
 aaggcaactg agatagttta tatctgttcc tttcagacct agatcctgca tgacttgggt 19440

gattggacca ccaagcgctc cgtgaggccc tatttcaata atcacatcga cggctttctc 19500
 tttagtggtg ggatcaaagc acatctcgcg gagtgaggac tcgaactcta ccggctgtag 19560
 catactatcc atccagtgtg tgggatccaa tagcaattta agatcgggtca tgcgactacc 19620
 agtccttaggt gatgaatata atacaccctt tgaggtgtca gcattgggat tgtcgttgtt 19680
 gttatccgag ttgaacagat ctctcagtga cgccccaaag gcatctgccca ttggtcgcat 19740
 gtggcttgaa tggaaggctt cagtgacttt cagtttctctg gtaaagatgc catcggcgtg 19800
 taacaacttt tcaagtttct cgattgcacc caaatctccc gacaccgtca cactacattg 19860
 actgttgata catccaacca ccacacagcc gtcctcctgg ttgagacgcg aaatgtaaac 19920
 attggtctca ctgcgaccaa gaccaccgc catcattcct cctttggctg ccaatgcggg 19980
 cttgggccta gtggtcaata caccgcgtat ataagtgatc ccaatggccg accgcgcgga 20040
 taaagcccca gctgcgtagg cagcagcagc ctctccactt gagtgactgg ttatccccgt 20100
 tggccgaatt ccccatgacc aaaggagacg cacaagtgc aattggatag cggttgacag 20160
 tggtagactg tattcggcat catttaccgc agtcgtcagc tcatcacggt ggagctcctc 20220
 tgtgcaattg aatgttagta cctcaagctt gatacagtat tacttttccc gggctcgcaa 20280
 cttaccata aaattccaac tcgcgccag ttgcttgatg tagccatcac attcaagaat 20340
 cgctgtttg aatactggga atgtattgac cagctctctg cccattgcat gccactgcgc 20400
 cccctgaccg gtgaatacaa atccgagccg tactttctca ttcgctcggt ttggttgatt 20460
 ggactcatcg ctgagggcag aaacaaggcc gccaaaggctg tctgctacat acactgacgt 20520
 ccatggcaga atggaacggc gagagcctag tgtataggcg aggctggcga ggaagggttc 20580
 cccgtcaatg tcagcgacgg atttaatgta gtctcgagg cttgctatcg ttcgccgaca 20640
 agcttgctcg tccttggcac gcacaacgta tatgcggctc tgtttggaac catcctcaac 20700
 cctaccatgc tcagagttac cattgacatg cacttgatcc tctggcaggg ccaatgatgc 20760
 gcgatcatat gattccaaaa tgacgtgagc attcgaacca ccaaagccga agttattgac 20820
 agatgcgcga cgagtcccat ctttcacagg ccagtcttga gcagacatgg ggatctttga 20880
 aacattaacc ttgaaacat ataactgaat ctgcgaatgc gcaaagcctt accttgatgt 20940
 tcttttggtc aagcatcagc ttgctgttct tttgcaggaa ccgcgcatta gggggaatca 21000
 agcccttctc caaggccaag gccaccttga ttatactggc caggccactg gcggcttctg 21060
 tatggccaat atttgcttct acagagccaa ggtgcagagg atgtccttta aaagctgctg 21120
 aaattgctga gatttcaagg gggtcaccag ttggtgttcc agttccgtgg gcctccacgt 21180

acgagggtcaa cgacatatct agcccagcct tatcgtaaca ctccctggatc agacttttct 21240
 gcgccacatc actcgggcga gtaattgcgg gtgtttttgcc atccctgggtc agcgcgtgtct 21300
 ctcgaaatgac ggctcggata gggctcttggt ctcgcaacgc gttagggagg gcctttatta 21360
 ccagagcggc aattccttcc ccgcgaccat atccattcgc tcgaggatca aaagagtacg 21420
 agataccatc cggggacaaa aatctgtcat tgagcaacaa ggattgctta gttcaagact 21480
 ctcgatctgg aatcttcttc ggaaaactca ccccagggtt gacatcgtaa caaaaacatc 21540
 gggattgagc agaagatttg caccgataac gatggctgta tctgactccc cagtacgtaa 21600
 gctctggcac gccaaagtga gtgcgggtcaa tgtcgtcgaa caggccgtgt caaccgtcac 21660
 gctggggacca cgtaagtcgt agaagtgtga tatccgggtc gaaagcattg ttcctgagtt 21720
 gccagttatg aaataacgcg gaactgtctc ggggtcacga ttgagcgaat cctgatagtc 21780
 gtggtacatg acacccccaa acaccgacgt attagagcct gccataccat cgatgggtgat 21840
 accggctgga tgatggctcag tgacgtttgc ttacagttag gatgaccac actacatacc 21900
 actctccagc gattcgtaga ccacctcaag cataagccga tactgcggat ccatgcactg 21960
 tccaatatta gatctctgcg tcccgggtta gatcaattga aataatcata cgctggcgac 22020
 ctctgtggtc atgttgaaga acgcggcgtc aaataaagca ggatcctcgt cgatgaagtg 22080
 tccacccttt acgtgggtct atccagtcct ccttggagtc agtaaccaag cttcagtgat 22140
 gctcaaatct tgtgtcaaat attcaaaaca agatataaat gcatgcatgt tagatactca 22200
 cggacccgac ctttcgccca ttccgggtggt atactcctct cacattgaat cgcgaggagg 22260
 ggaccttaga ccaggcactg cctcctcttt caaccatttc ccaaagcttc tgtggactcg 22320
 ttgcatctcc agcaaatega catcccatc caactatggc aatgggcgtg gatgtgttag 22380
 agcaagccga gcctgccatt gcggttgcgg ttgcggttgc ggttgcggtt gcggttacgg 22440
 cgggggtatt gttcattcca acgttgtttc attgactgat atatcagtcg ccctgggtgat 22500
 aaaaccgttg atagtcttcc aacagtctac aggtccctgg catagctata gatgcataag 22560
 ctgccccga cacgtgattc atagttcggg gtttgttttc atcttggacg tgacacgata 22620
 ttgcgtctgt gcccatggga aaccccggac caccatgcta tgctcggggc aataccttag 22680
 aggtaccggt tcgggaggca ttgtctgtcg tcacgataat cccgagtcaa aacgccgatg 22740
 ggaaaccgtc gaacaagacg aaacagggtc ggccggccag gtagttttcg ggtataatgg 22800
 aggctgtcag aatccgatac tccgtacaca gatgcgaaat acgcatacga gctatcaaac 22860
 caaacgaatc caaaagcctt ggaaaagctt ggaaaggctt agtgggtaat cctgtcccaa 22920

ggtttgttga gggcctgagc gcagggtggg tcctgtaagc agttggtaat tcaatttcca 22980
 acaatacaca atccccaaaa ttgtcattat cggttgacta agacaagcaa acaaaatata 23040
 tgcaggaagc gcaattcatc gcgagcaaac gatcatcatg agcatgtgac cttttcctct 23100
 tttttctact tcggaaggcg gcatgatcat ctgtcagaac tccaatcgg gagcaatacc 23160
 ataccttacg gcacccact cagacccatg cacaagaaa atccatgcgc cgaatattga 23220
 agccttggca acaaagcccc gtgtaactcc gaaggatatcc aaagaccgag agacgccgat 23280
 ttgagagaca cgtacggagg tccacacaaa atgttcccga gtctatacac tatactccaa 23340
 actgacttct tgtctacctg ggtatcttgt tcaggttgct gtttactgag ataaatgata 23400
 ccggggggggg gggggggggg ggggggtgac actggctttt cgtggacaga ataataccca 23460
 tacatccctg cgtaagtagt cgtttcgaga agaatgtgtt tcgtgggtgca ttactccgta 23520
 ggcacaatat atttccattc ctcacgaagt ggccctcgtcc gggcgtgac gatgcagctt 23580
 gccgccccac caaaaaagga ccacaatacg agtcagatta gaaacgtcta acaggacgtc 23640
 tatgtaagag gacgctcctt tgtatgtcgg atctaggcat gacaaaataa ctatacctag 23700
 gtagtgttct gtcttattgg tcatttggcc tactttcgga acaatcttgg aagttcacat 23760
 tcctaggtat cagggaatt gattgggtgc cccagaattc ttttttctcg aataaaggat 23820
 aaatttatgc ataaaaacct tggaaactga gcatagttat gagcacaat actagttttc 23880
 agtgcaattg gtctactat cctttgcttg gtaccctta ccaattatac cctaggcagc 23940
 agttgacacc ggtcatgaat ccattcataa aggtggacca gatgcaggga taaggaagcg 24000
 aatctttccg ctgcctcagc ctcagggcg cgcgccattt gttattttct tctactcatt 24060
 tcccgtaacct aggaactgtt cagttgtccc tccaacccc ttgggccgaa caaccttct 24120
 ccaatctacg acggcagatt atacctaggc gcctaaccga ttaggttgct cattcgattt 24180
 tggaggtatg cactttatct caagccctaa ttccaattg aagtgccttt ccgtcccat 24240
 ttgcagagct gactagattc ttttctcaga gactacctag ctataggtag cactccaagc 24300
 tgtagcacag acctttcagc atggtcgctt cgttgctacc ctctcgcttt cgcggtaggg 24360
 aatcaatgaa tcagcagcac cctctacgct cgggaaatcg ggcattgacc tccacactcc 24420
 aattttctatc caaaacggcg tgtctacacc cgatccatac cgtttgcacc atagctattc 24480
 tagctagtac cacatacgtt ggactactca aagacagctt cttccatggc cccgcaaacg 24540
 ttgataaagc agaatggggc tctttggctg aaggaagtcg aagcttgatc accggccac 24600
 agaatggctg gaagtggcag agcttcgacg gggatgcaga tgttctcgga gatttcaacc 24660

atcaagcact aatgaccttg gtattcccgg ggtcatatgg ggttgcattt caagcagcct 24720
 caccattcct tgctcccctc cctgtgaacc tatctgtgat tgaccttccc tcaacgtcga 24780
 gccctttaac cgcctattcg aaagataaag ttttcgcctt ctctgtggaa tacagcagcg 24840
 cgccggaact cgtggctgct gttcaagaaa tccccaaaca cagtgccgac ctgaaattgc 24900
 aggagacgca attgatcgag atggaacgcc agatgtggat catgaaggct gccagggctc 24960
 acacaaaacg cagccttgct caatgggtgc acgatacctg gacagagtct cttgatctta 25020
 tcaagagcgc tcaaacgctc gacgtggttg tcatggtgct aggttatata tcaatgcaact 25080
 tgactttcgt ctactcttc ctacgcatga aaaaattggg atcgaagggt tggctggcta 25140
 caagcgtcct tttgtcgtca acatttgcct ttctcctcgg tctcgacgtg gccataagac 25200
 taggggttcc gatgagcatg aggttgctat ccgaaggcct ccccttcttg gtggtgatcg 25260
 ttggctttga gaagagcatc actctgacca gggctgtttt gtcctatgct gtgcagcacc 25320
 gaaagcccca gaagatacag tctgaccagg gtagcgtgac agccattgct gaaagtacca 25380
 tcaattacgc cgtacgaagc gccattcggg agaagggtta caatatcgtg tgccactacg 25440
 tggtcgagat cctgctccta gttatcgggt ctgtcttagg catccaagggt gggctacagc 25500
 acttctgtgt tctagctgca ttgatcctgt tctttgactg tctgctgctg ttacattct 25560
 aactgcgat tctgtctatc aagctcgagg taaaccgcct caaacgtcat atcaacatgc 25620
 ggtacgcgtt ggaagatgag ggtctcagtc agcggacggc ggagagtgtc gcgaccagca 25680
 atgatgcca agacagtgca cgtacatatc tgtttgcaa tgatatgaaa ggcagcagtg 25740
 ttccgaagtt caaattctgg atggctgttg gtttcttat cgtcaacctc gtcaacatcg 25800
 gctccaccct tttccaagcc tcttctagt gatcgttgc cagtatatca tcttgaccg 25860
 aaagtctgag cggatcggcc attaaacccc cgcttgagcc cttcaaggta gctggaagt 25920
 gactagatga actacttttc caggcaagag ggcgcggtca atcgactatg gtcactgtcc 25980
 tcgcccccat caagtacgaa ctagagtatc cttccattca ccgttggtacc tcgcagctac 26040
 acgagtatgg agttggtgga aaaatggctg gtagcctgct caccagcctg gaagatcccg 26100
 tcctctccaa atgggtgttt gtggcacttg ccctaagtgt cgctctgaac agctatctgt 26160
 tcaaggccgc cagactggga atcaaagatc ctaatctccc gagtcacca gttgatccag 26220
 ttgagcttga ccaggccgaa agcttcaacg ctgccagaa ccagaccctc cagattcaat 26280
 caagtctcca agctcctcag accagagtgt tcactcctac caccaccgac agtgacagt 26340
 atgcctcatt agtcttaatt aaagcatctc taaagggtcac taagcgagca gaaggaaaga 26400

cagccactag tgaacttccc gtgtctcgca cacaaatcga actggacaat ttgctgaagc 26460
 agaacacaat cagcgagttg aacgatgagg atgtcgttgc cttgtctttg cggggaaagg 26520
 ttcccgggta tgccctagag aagagtctca aagactgcac tcgtgccgtc aaggttcgcc 26580
 gctctatcat ttcgaggaca ccggctaccg cagagcttac aagtatgctg gagcactcga 26640
 agctgccgta cgaaaactac gcctgggaac gcgtgctcgg tgcatgttgc gagaacgtta 26700
 ttggctatat gccagtcctt gttggcgctc ccggtcctat tgttatcgac ggcaagagtt 26760
 atttcattcc tatggcaacc accgagggcg tcctcgtcgc tagtgctagc cgtggcagta 26820
 aggcaatcaa cctcgggtggc ggtgccgtga cagtcctgac tggcgacggt atgacacgag 26880
 gcccggtgtg gaagtttgat gtccttgaac gagctggtgc tgctaagatc tggctcgatt 26940
 cggacgtcgg ccagaccgta atgaaagaag ccttcaattc aaccagcaga tttgcgcgct 27000
 taaaaagtat gcggacaact atcgccggtg ctcaattata tattcgattt aagactacta 27060
 ctggcgacgc tatgggaatg aatatgattt ctaagggcgt ggagcatgca ctgaatgtta 27120
 tggcgacaga ggcaggtttc agcgatatga atattattac cctatcagga aattactgta 27180
 cggataagaa accttcagct ttgaattgga tcgatggacg gggcaagggc attgtggccg 27240
 aagccatcat accggcgaac gttgtcaggg atgtcttaaa gagcgatgtg gatagcatgg 27300
 ttcagctcaa catatcgaaa aatctgattg ggtccgctat ggctggctca gttggcggct 27360
 tcaacgcccc agctgccaat cttgcggcag ccattttcat tgccacaggt caggatccgg 27420
 cgcaagtigt ggagagcgct aactgcatca ctctcatgaa caagtaagtt gaaagcggcc 27480
 gcttacttgg aaacattcac taatcctggt tagtcttcgc ggatcgcttc aaatctctgt 27540
 ctccatgccg tctattgagg ttggaacgtt gggcggtggt acgattctgg agccccagg 27600
 cgcaatgctt gacatgcttg gtgtccgcgg atcacacccg accactcccg gtgagaatgc 27660
 acgtcaactt gcgcgcatca tcggaagcgc tgttttggct ggggagctct cgctatgtgc 27720
 tgccctagcc gccggtcacc tggtaaggc gcacatggcg cacaaccgtt ctgccccggc 27780
 atcttcagcc ccttctcgaa gtgtctcccc gtcaggcgga accaggacag tccctgttcc 27840
 taacaatgca ctgaggccga gtgctgcagc tactgatcgg gctcgacgct gattaggtcg 27900
 gaatcttagg agcattccaa gctccgtacc cctccagtg gattcattgc aggaggatca 27960
 tattttttct cattggttgt tattgtcata attttcaaaa gcacaatgca atgagacagg 28020
 caggtggtag agtgaacggc cagaaagggt atctcatgtt tatatgttgt tgaaatttac 28080
 gatgcaagta gtagggaaga agaatatata aagagatggt ctttttcag agagtgttta 28140

ggtctgatcc ctcataatta tttaatgagt gaaagctttg ttcaagctat aacttactga 28200
 gtaggttgaa tgttgatctg attcattcct gaggtatcag gattgatgcc tgaacatca 28260
 atcatccatt gtcagatgcc gtaactaact aactatgaat ctcaacatag ttatatgttg 28320
 ccaatctagc cacggtgact agaaccttga gatggactta gactagacat gggtcgcggg 28380
 caatgacata tagaatcttt gaaatcgaca ttaattaagt atgtggagat tctttgtgga 28440
 ggacacggtta tgtgtctatc tagcaacgcg gtcaagcatc agtctcaggc acagcccggg 28500
 tgtcgTTTTT ggttgcaatc ttccgccatc ccattccaaa ggcaaacaca aacgtgcacg 28560
 ccgtagctcc cactgctaag taaaaagtat gatcaacggc gagactgtaa gcttttacia 28620
 cccctggaag gttattcttg ctgaccacat ctctgaagcc agtcgcccct gctgccgtca 28680
 cggcctgcgt gtcgacagtg ggcgcatact tgctcaggcc agttctcaaa ccggacccaa 28740
 agacaagggt agcaaagtcc aggaagagcg atcctccaaa cgtctgtcca aacacggcga 28800
 gagaaattcc gagggcacct tgttcgggcg aaagcgtgct ttggatggcg atgataggct 28860
 ggccattgag tattgatgtc agcgtctagc ggttgcattg tcttcttgct ttgatacaaa 28920
 gccgaaagcg tgagagatga tcaaagggtt catagcttac cgtttgcatt ccacaaccac 28980
 gaccgaagcc cgcgataaat tggatcatga cccatttcac agttgatgta tggggctgga 29040
 aggtggatac cagacctgcg cctatggcga cgagaacagc gctgcctagg gcccaaggca 29100
 aatagtatcc tgtctttcca actgggtgcg catatgtcag tatacacgat atccaagccc 29160
 gatgtcagac ggttgtggca agaaaggagc catagaaatg gacgggggtg agaaaaatgt 29220
 gtacgcgagt ttacttact tgcgaagcca gaaacatag ccataatgac ttgtccaaga 29280
 attccaggca acatgtacac accactcagt gtgggagaaa catccttcac agcctggaag 29340
 tagatcggtg gatagtagga aaagacaagc aaggagccag agaaaaagcc cataaataaa 29400
 caagagcacc acacttgtcg ttaccagcc actgagccag gaatcatggc aacagcatcg 29460
 ccaacatgac gctcccatag cacgaacgca atcagagcaa accctccgcc acagaacagg 29520
 ccgatgatga cggaacttcg ccaggtgtag gtcgaccctc ccatttctag tgcgagggaa 29580
 atcatgggtg cgaaggctgc aaagaccaca aagcctacaa ggtccagttt gcgaagtgtg 29640
 gattttatgt tggccattgg ttgtcggtc gagagttcgc tgtccgtgga tgaaattcgg 29700
 tcgggtatgg tgatgacgag aaggaggaat gcagcgacag cgccgatggg gagattgata 29760
 taaaagcctg aattccaagt gagaacatgg acaacaatca taaaaggcc aaaggtcaac 29820
 atacaccatc gccaaagtggc gtgttgagtg aaagcacctc cgagcagtgg tccacagaca 29880

atggcaatct gactaactga aaacatattg tcagacgacg aaccgttcgt ttgggggtaca 29940
tcagatcttg agatgacata cgacccatca tcactccaat caaaacttca tatgcgaggt 30000
cagcgtgtac acggcaccca gcagacttcc aaaaatcggt tcccttacct ggttgcttgt 30060
gcttaggagc agctgttgag aggattgtga gggctccgtt gacaagacct gagcctccca 30120
ttccagcaac ggcccgccca acaatcaaca tgggtgaaga tcttgcgga cgcgatagca 30180
ccgagcctag ttcaaaaata cagaggaagg caaagaaagt gtacttcaag cccaagagtg 30240
tatacaattt accggccagg ggctggagag cacagctaaa tatgatgtta gctaactctgt 30300
tcgtacaatg aacaaggta aggagaacag agccatactt agccagaaga taagcactgc 30360
cgtaccaccc tacatcggtc agagagtga actcgcttgt gatatgtggg attgcctgtg 30420
gctggagtca attgactgtg ctgcgctctg ttctgaggta gccaccatct taccgtgacg 30480
ataatggaca tatcaaggag catcaaaaat gctacgaaag taactgaagc aaccaccagc 30540
ccgagcttga ggctgtgat gtgctgggac ttggactcag tcgcttcgag cgtgtcattt 30600
tgactttctt ccttctgtgg ccttggttcc ctttctttag ggggtagagg ttctgacatc 30660
gcgcaattcc ttccgacttt tgcttcaagg ggcgggtgtga atctctactg cgcggcgctt 30720
ctatagtacc tgtgttttgg tgtatgaatg atctcgctct cgttgtttcg ttaagggtccg 30780
ctagcctgaa gtcagattga tggatgggga tcaggggaaa ttggcgacgt ctttaatttt 30840
gcttttcttt gttaccggaa gtgttgcggt attagcgtgt ctgggcttat ttacgacgca 30900
caagatgcat tgaactggcc ccaactgctag atctcactag tattgtgggt gtaatttacc 30960
tatactccat attgactggg caggttttga acacaacca cccccccca tactacacat 31020
tagttttgca tattttcctg ggggccaaaa aaaccccaaa aggccttcaat attttgcggc 31080
caatggagag tgtaactaat ttggcccaca ctccggtggt atcaatcgga tctcactgca 31140
tatatgatga aagcaagagg gggcaggaga tacgctcttt attggctgtc tgcgcgaagc 31200
tgggcaaatg caaataaaaa gacaaacaac cagctggaag accgggacgac aaacatggtt 31260
tacctaacac cctcgatccc aacaatgtgc atgttaatca atgtgctccg tggggagtat 31320
gaactataac atacgaagca gccattcatg tcaaaaaaaaa aaccaggcga atgggcgtcg 31380
tcaacggttt cacataagta ctatatgtga ctaactaccg gtgagactgg agagaacagt 31440
ctcgcgcgaa gaaacgataa gagcatcggt catatcggtc catctcggtc taagtgtatg 31500
agaatattcc gacgtgaatc catccgtcag tgatcaatgt ctccaagtaa ttcatcattt 31560
caattaccct cgctttactc cgtagaatac aagaccttac tagcgcaaac aagtgggggc 31620

taacggtgtg atctccttcc gttgcggccg ccacctcggt tccagccgta atacgacgac 31680
 ccgtctatcg cgacccccta gccttggcca tttttggcgt tacagtaaag ctttggagag 31740
 aaacgccaag ggaaaatgct agccaccaat tctataaatt actcttcaca tgcagctagt 31800
 atcactggta agtctacggg gcacatgtaa aatTTTTtatt acttttctaataaatcttttcca 31860
 agttcttttc cacggggccc caatgcttaa aatactcaaa agacgtgaaa aacctgcaag 31920
 ccgccagtga tatcacacgt aatgcctcaa cagcctgatt ccgagccatt atatgctgtt 31980
 tgatgatctc aaattgagat ggcgagcgct ggatctggga aattggtagt gggattggta 32040
 tagaaacgta agtgcagaag accatgtaat aagtacatat ggaggctatg tgatggcccg 32100
 atctagtttc ttcaatatag cgctgggtat aaaaaaagc aggggctttc tcagggtaat 32160
 gtcgcagtct acaacgagtg gcgtccactg acagggaag gcgagcgggg ctatgctacc 32220
 ttcaatttcc atagaggggg gatgcacat ctccgacaat ctatagttac tcaaacaggt 32280
 acggtactaa gcaatattgt gtttcttcgc taatgcgaat atttccttat agcaacgtcg 32340
 caacacattt atcgtcttcc ctgaggcctt tgttgacttg ggctcttcgt ctccggcttc 32400
 gtcactccaa agcacagata ggagacgaga ggccggcggt atggttttat tttcagcgcc 32460
 aaggatttgc cacgatgtgc ttggcatatc tgataggacc tattccccct ctcccggtca 32520
 gcgcattgct gatgtatgca agggaagaaa agactgggtg ttatcggtcc cacttactag 32580
 acgaatagat gccgcagccc cgtgctcctg tgctatcccc aaagcagtct caatctcact 32640
 caatagtcga aggccttacac gcaatgtcgt gcatgcagaa gataaggcgt gcatgaatgg 32700
 gtcgagatgt gaaatgagct cgccgatatg aagattagag tgaaacgagg gaagtgttc 32760
 ggctcttcca ttgtcatttc tagtggttga gccagaccag taccaatcca ttcgtgtgct 32820
 ttgcttttgt ccacaagggtt gggctttcat cacctcggat agtagcagct gggaaagtga 32880
 tgtcatgatt ttgacagaca acatgtagca atgcaccgcc atgaacaagt tcttggtttg 32940
 cagacacca tctaacatgc tgctattgct gtcgtgatc acacgttctt gaagatgtag 33000
 tagcaatcta ccaaaggcat tcaaaaagtc ccctatcggg tctaggaaga agcttttagcg 33060
 acaatcaaga ggcagtaaac aggcagaatt gaaaatctca cagcttaaaa ttttttgctt 33120
 gggccattcc acagtcaccc cgtggagtat tacctctagg tcctgtgaca catccgacag 33180
 actttcgaaa aggtctcgtt gcgtgttgct tgtgttggtat tgtccggatg acgagttccc 33240
 ctctacttcg aggtcaaaca gcgatggcga gacaggcgcc gttgcatcca aagggccttc 33300
 aaagtcgtag cctagatctg gtatccccga agattcattg ctgttggcat cgtcgcgaaa 33360

tgtatttggc tgaggccagc cgccgggaaa cgactcggga tcatcaaagt tgattgatgt 33420
atcatagaat tgcagggttg ccgctgatgg ttctgataat gtttccttga gtgccgaggt 33480
gccaatatgc gtaggtggtg agcagtaagg tggaggagtc tctgccaatg atgagaagac 33540
cgtagaagat gtcgcggtca tcggttgtga ggtttctgtg gctctttag ttccagctgc 33600
ggcttcttta tgtaaattgc gcttgggtag ctttctgtg tacacacacc ttaatccggc 33660
ttgttgacaa cgttgacact gagcacggac taaattggca ttgctaccgg tacatttgag 33720
cttttgtgca tgacaccggt cacatgagcg tcgaaacgcg cgacggcgta ggttcgtcgg 33780
aatcgttgca tgcggcaggg acataattat tggattaaga tcaaataatg tgaggtgaga 33840
ctttgcatgt tcctggatct ttatgtattg gaattggaga gtaagctcgt gcaggagata 33900
agttcaggtc gtcttgctgg aagacttact aagttatatg caaacaagtg ttttcgagcg 33960
gacacaaaaa gccaatagtc ttactatgaa tgtcttttca gtcacccgga gaaatactct 34020
tagcctctgc tcttatgcga gctcatcaaa gctgggcata catacccat ccagcgccac 34080
gtattacact agaaagagtt ctaaaagaaa tagattcggc ccccatctg gctatcatat 34140
atgccagatg aaatacctgt aacgtggggc ataaaaaggc aggctctagt ctaccagcag 34200
atc 34203

<210> 2

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 2

gatctgctgg tagactagag cctgcctttt tatgccccac gttacaggta tttcatctgg 60
catatatgat agccagatgg ggggccgaat ctatttcttt tagaactctt tctagtgtaa 120
tacgtggcgc tggatggggt atgtatgcc agctttgatg agctcgcata agagcagagg 180
ctaagagtat ttctccgggt gactgaaaag acattcatag taagactatt ggcttttgggt 240
gtccgctcga aaacacttgt ttgcatataa cttagtaagt cttccagcaa gacgacctga 300
acttatctcc tgcacgagct tactctccaa ttccaataca taaagatcca ggaacatgca 360
aagtctcacc tcacattatt tgatcttaat ccaataatta tgtccctgcc gcatgcaacg 420

attccgacga acctacgccg tcgcgcgttt cgacgctcat gtgaccggtg tcatgcacaa 480
 aagctcaaat gtaccggtag caatgccaat ttagtccgtg ctcagtgtca acgttgtcaa 540
 caagccggat taaggtgtgt gtacagcgaa aggctacca agcgcaattt acataaagaa 600
 gccgcagctg gaactacaag agccacagaa acctcacaac cgatgaccgc gacatcttct 660
 acggtcttct catcattggc agagactcct ccaccttact gctcaccacc tacgcatatt 720
 ggcacctcgg cactcaagga aacattatca gaaccatcag cggcaaccct gcaattctat 780
 gatacatcaa tcaactttga tgatcccgag tcgtttcccg gcggctggcc tcagccaaat 840
 acatttcgcg acgatgccaa cagcaatgaa tcttcgggga taccagatct aggctacgac 900
 tttgaaggcc ctttgatgc aacggcgcct gtctcgccat cgctgtttga cctcgaagta 960
 gaggggaact cgtcatccgg acaatccaac acaagcaaca cgcaacgaga ctttttcgaa 1020
 agtctgtcgg atgtgtcaca ggacctagag gtaatactcc acgggggtgac tgtggaatgg 1080
 cccaagcaaa aaattttaag ctgtgagatt ttcaattctg cctgttttact gcctcttgat 1140
 tgtcgctaaa gcttcttctt agacccgata ggggactttt tgaatgcctt tggtagattg 1200
 ctactacatc ttcaagaacg tgtgatcacg agcagcaata gcagcatgtt agatgggtgt 1260
 ctgcaaacca agaacttggt catggcggtg cattgctaca tgttgtctgt caaaatcatg 1320
 acatcacttt ccagctgct actatccgag gtgatgaaag cccaaccttg tggacaaaag 1380
 caaagcacac gaatggattg gtactgggtc ggctcaacca ctagaaatga caatggaaga 1440
 gccgaagcac ttccctcggt tcaacttaat cttcatatcg gcgagctcat ttacatctc 1500
 gacccattca tgcacgcctt atcttctgca tgcacgacat tgcgtgtaag ccttcgacta 1560
 ttgagtgaga ttgagactgc tttggggata gcacaggagc acggggctgc ggcatctatt 1620
 cgtctagtaa gtgggaccga taaccaccag tcttttcttc ccttgcatatc atcagcaatg 1680
 cgctgaccgg gagaggggga ataggtccta tcagatatgc caagcacatc gtggcaaate 1740
 cttggcgtg aaaataaaac cataacgccg gcctctcgtc tctatctgt gctttggagt 1800
 gacgaagccg gagacgaaga gcccaagtca acaaaggcct cagggaagac gataaatgtg 1860
 ttgcgacgtt gctataagga aatattcgca ttagcgaaga aacacaatat tgcttagtac 1920
 cgtacctgtt tgagtaacta tagattgtcg gagatgggtc atccccctc tatggaaatt 1980
 gaaggtagca tagccccgt cgcctttccc tgtcagtggc cgccactcgt ttagactgc 2040
 gacattaccc tgagaaagcc cctgcttttt ttataacca gcgctatatt gaagaaacta 2100
 gatcgggcca tcacatagcc tccatattgta cttattacat ggtcttctgc acttacgttt 2160

ctataccaat cccactacca atttcccaga tccagcgctc gccatctcaa tttgagatca 2220
 tcaaacagca tataatggct cggaatcagg ctgttgaggc attacgtgtg atatcactgg 2280
 cggcttgca gtttttcacg tcttttgagt attttaagca ttggggcccc gtggaaaaga 2340
 acttggaag attattagaa agtaataaaa attttacatg tgccccgtag acttaccagt 2400
 gatactagct gcatgtgaag agtaatttat agaattgggtg gctagcattt tcccttggcg 2460
 tttctctcca aagctttact gtaacgcaa aaatggcaa ggctaggggg tcgcataga 2520
 cgggtcgtcg tattacggct ggaaccgagg tggcgccgc aacggaagga gatcacaccg 2580
 ttagcccca cttgtttgcg ctagtaaggc cttgtattct acggagtaa gcgagggtaa 2640
 ttgaaatgat gaattacttg gagacattga tctactgacg atggattcac gtcggaatat 2700
 tctcatacac ttagaccgag atggaccgat atgaccgatg ctcttatcgt ttcttcgcgc 2760
 gagactgttc tctccagtct caccggtagt tagtacaata tagtacttat gtgaaaccgt 2820
 tgacgacgcc cattcgctg gtttttttt tgacatgaat ggctgcttcg tatgttatag 2880
 ttcatactcc ccacggagca cattgattaa catgcacatt gttgggatcg aggggtgttag 2940
 gtaaaccatg tttgtcgccc ggtcttccag ctggttgttt gtctttttat ttgcatttgc 3000
 ccagcttcgc gcagacagcc aataaagagc gtatctcctg cccctcttg ctttcatcat 3060
 atatgcagtg agatccgatt gataccaccg gagtgtgggc caaattagtt acactctcca 3120
 ttggccgcaa aatattgaag ccttttgggg ttttttggc cccaggaaa atatgcaaaa 3180
 ctaatgtgta gtatgggggg gtgtgggttg tgttcaaac ctgccagtc aatatggagt 3240
 ataggtaaat tacaaccaca atactagtga gatctagcag tggggccagt tcaatgcac 3300
 ttgtgcgtcg taaataagcc cagacacgct aataccgcaa cacttccgtt aacaaagaaa 3360
 agcaaaatta aagacgtcg caatttcccc tgatcccat ccatcaatct gacttcaggc 3420
 tagcggacct taacgaaaca acgagagcga gatcattcat acacaaaac acaggtacta 3480
 tagaagcgcc gcgcagtaga gattcacacc gcccttgaa gcaaaagtcg gaaggaattg 3540
 cgcgatgtca gaacctctac cccctaaaga aggggaacca aggccacaga aggaagaaag 3600
 tcaaaatgac acgctcgaag cgactgagtc caagtcccag cacatcacag gcctcaagct 3660
 cgggctgggtg gttgcttcag ttactttcgt agcatttttg atgctccttg atatgtccat 3720
 tatcgtcacg gtaagatggt ggctacctca gaacagagcg cagcacagtc aattgactcc 3780
 agccacaggc aatcccat atcacaagcg agttccactc tctgaacgat gtagggtggt 3840
 acggcagtg tttatctctg gctaagtatg gctctgttct cttgacctt gttcattgta 3900

cgaacagatt agctaacatc atatttagct gtgctctcca gcccctggcc ggtaaattgt 3960
 atacactctt gggcttgaag tacactttct ttgccttcct ctgtattttt gaactaggct 4020
 cggtgctatg cggtgccgca agatcttcca ccatgttgat tgttgggcgg gccgttgctg 4080
 gaatgggagg ctcaggctct gtcaacggag ccctcacaat cctctcaaca gctgctccta 4140
 agcacaagca accaggtaag ggaaccgatt tttggaagtc tgctgggtgc cgtgtacacg 4200
 ctgacctcgc atatgaagtt ttgattggag tgatgatggg tcgtatgtca tctcaagatc 4260
 tgatgtaccc caaacgaacg gttcgtcgtc tgacaatatg ttttcagtta gtcagattgc 4320
 cattgtctgt ggaccactgc tcggagggtgc tttcactcaa cagccactt ggcgatgggtg 4380
 tatgttgacc tttggccttt ttatgattgt tgtccatgtt ctcacttgga attcaggctt 4440
 ttatatcaat ctccccatcg gcgctgtcgc tgcattcctc cttctcgtca tcaccatacc 4500
 cgaccgaatt tcatccacgg acagcgaact ctcgaccgac aaaccaatgg ccaacataaa 4560
 atccacactt cgcaaactgg acctttagg ctttgtggtc tttgcagcct tcgcaaccat 4620
 gatttccctc gcactagaat ggggagggtc gacctacacc tggcgaagtt ccgtcatcat 4680
 cggcctgttc tgtggcggag ggtttgctct gattgcgttc gtgctatggg agcgtcatgt 4740
 tggcgatgct gttgccatga ttcttggtc agtggttggt aaacgacaag tgtggtgctc 4800
 ttgtttatatt atgggctttt tctctggctc cttgcttgtc ttttctact atctaccgat 4860
 ctacttccag gctgtgaagg atgtttctcc cacactgagt ggtgtgtaca tgttgccctgg 4920
 aattcttggg caagtcatta tggctatggt ttctggcttc gcaagtaagt gaaactcgcg 4980
 tacacatttt tctccacccc gtccatttct atggctcctt tcttgccaca accgtctgac 5040
 atcgggcttg gatatcgtgt atactgacat atgacgcacc agttggaaag acaggatact 5100
 atttgccctg ggccctaggc agcgtgttgc tcgtcgccat aggcgcagggt ctggtatcca 5160
 ccttccagcc ccatacatca actgtgaaat gggcatgta ccaatttata gcgggcttcg 5220
 gtcgtggttg tggcatgcaa acggtaaagt atgaaacctt tgatcatctc tcacgttttc 5280
 ggctttgtat caaagcaaga agagcatgca accgctagac gctgacatca atactcaatg 5340
 gccagcctat catcgccatc caaagcacgc tttcgcccga acaagggtgcc ctcggaattt 5400
 ctctcgccgt gtttggacag acgtttggag gatcgctctt cctggacttt gctaaccttg 5460
 tctttgggtc cggtttgaga actggcctga gcaagtatgc gccactgtc gacacgcagg 5520
 ccgtgacggc agcaggggag actggcttca gagatgtggt cagcaagaat aacctccag 5580
 gggttgtaaa agcttacagt ctcgccgttg atcatacttt ttacttagca gtgggagcta 5640

cggcgtgcac gtttgtgttt gcctttggaa tgggatggcg gaagattgca accaaaaacg 5700
 acacccgggc tgtgcctgag actgatgctt gaccgcgttg ctagatagac acattaccgt 5760
 gcctccacaa agaatctcca catacttaat taatgtcgat ttcaaagatt ctatatgtca 5820
 ttgcccgcga cccatgtcta gtctaagtcc atctcaaggt tctagtcacc gtggctagat 5880
 tggcaacata taactatgtt gagattcata gttagttagt tacggcatct gacaatggat 5940
 gattgatgtt tcaggcatca atcctgatac ctcaggaatg aatcagatca acattcaacc 6000
 tactcagtaa gttatagctt gaacaaagct ttcactcatt aaataattat gagggatcag 6060
 acctaaacac tctctggaaa aggaccatct ctttatatat tcttcttccc tactacttgc 6120
 atcgtaaatt tcaacaacat ataaacatga gatacccttt ctggccgttc actctaccac 6180
 ctgcctgtct cattgcattg tgcttttgaa aattatgaca ataacaacca atgagaaaaa 6240
 atatgatcct cctgcaatga atccactgga gggggtacgg agcttggaat gctcctaaga 6300
 ttccgaccta atcagcgtcg agcccgatca gtagctgcag cactcggcct cagtgcattg 6360
 ttaggaacag ggactgtcct ggttccgcct gacggggaga cacttcgaga aggggctgaa 6420
 gatgccgggg cagaacggtt gtgcgccatg tgcgccttga ccaggtgacc ggccggctagg 6480
 gcagcacata gcgagagctc cccagccaaa acagcgcttc cgatgatgcg cgcaagttga 6540
 cgtgcattct caccgggagt ggtcgggtgt gatccgcgga caccaagcat gtcaagcatt 6600
 gcgccctggg gctccagaat cgtaccaccg cccaacgttc caacctcaat agacggcatg 6660
 gagacagaga tttgaagcga tccgcgaaga ctaaacagga ttagtgaatg tttccaagta 6720
 agcggccgct ttcaacttac ttgttcatga gagtgatgca gttagcgctc tccacaactt 6780
 gcgccggatc ctgacctgtg gcaatgaaaa tggctgccgc aagattggca gcttgggcgt 6840
 tgaagccgcc aactgagcca gccatagcgg acccaatcag atttttcgat atgttgagct 6900
 gaaccatgct atccacatcg ctctttaaga catccctgac aacgttcgcc ggtatgatgg 6960
 cttcggccac aatgcccttg ccccgctccat cgatccaatt caaagctgaa ggtttcttat 7020
 ccgtacagta atttcctgat agggtaataa tattcatatc gctgaaacct gcctctgtcg 7080
 ccataacatt cagtgcattg tccacgccct tagaaatcat attcattccc atagcgtcgc 7140
 cagtagtagt cttaaactga atatataagt gagtaccggc gatagttgtc cgcatacttt 7200
 gtaagcgcgc aaatctgctg gttgaattga aggttcttt cattacggtc tggccgacgt 7260
 ccgaatcgag ccagatctta gcagcaccag ctcgttcaag gacatcaaac ttcacacacg 7320
 ggccctcgtgt cataccgtcg ccagtcagga ctgtcacggc accgccaccg aggttgattg 7380

ccttactgcc acggctagca ctagecgacga ggacgccctc ggtggttgcc ataggaatga 7440
 aataactctt gccgtcgata acaataggac cggcgacgcc aacagggact ggcatatagc 7500
 caataacgtt ctcgcaacat gcaccgagca cgcgttccca ggcgtagttt tcgtacggca 7560
 gcttcgagtg ctccagcata cttgtaagct ctgcggtagc cgggtgtcctc gaaatgatag 7620
 agcggcgcaac cttgacggca cgagtgcagt ctttgagact cttctctagg gcatacccg 7680
 gaacctttcc ccgcaaagac aaggcaacga catcctcatc gttcaactcg ctgatttgtgt 7740
 tctgcttcag caaattgtcc agttcgattt gtgtgcgaga cacgggaagt tcactagtgg 7800
 ctgtctttcc ttctgctcgc ttagtgacct ttagagatgc ttttaattaag actaatgagg 7860
 catcactgtc actgtcgggtg gtggtaggag tgaacactct ggtctgagga gcttgagac 7920
 ttgattgaat ctgaggggtc tggttctggg cagcgttgaa gctttcggcc tggtaagct 7980
 caactggatc aactgggtga ctcgggagat taggatcttt gattcccagt ctggcggcct 8040
 tgaacagata gctgttcaga gcgacactta gggcaagtgc cacaacacc catttgagga 8100
 ggacgggatc ttccaggctg gtgagcaggc taccgacct tttccacca actccatact 8160
 cgtgtagctg cgaggtacca cggatgaatgg aaggatactc tagttcgtag ttgatggggg 8220
 cgaggacagt gaccatagtc gattgaccgc gccctcttgc ctggaaaagt agttcatcta 8280
 gtccacttcc agctaccttg aagggtcaa gcgggggttt aatggccgat ccgctcagac 8340
 tttcgggtcca agatgatata ctggacaacg atccactaga agaggcttgg aaaagggtgg 8400
 agccgatgtt gacgaggttg acgataagga aaccaacgac catccagaat ttgaacttcg 8460
 gaacactgct gcctttcata tcattgcaa acagatatgt acgtgcactg tcttgggcat 8520
 cattgctggt cgcgacactc tccgccgtcc gctgactgag accctcatct tccaacgcgt 8580
 accgcatgtt gatatgacgt ttgaggcgggt ttacctgag cttgatagac agaatcgag 8640
 tgtagaatgt aaacagcagc agacagtcaa agaacaggat caatgcagct agaacacaga 8700
 agtgctgtag ccaccttgg atgcctaaga cagcaccgat aactaggagc aggatctcga 8760
 ccacgtagtg gcacacgata ttgtaaccct tctcccgaat ggcgcttcgt acggcgtaat 8820
 tgatggtact ttcagcaatg gctgtcacgc taccctggtc agactgtatc ttctggggct 8880
 ttcggtgctg cacagcatag gacaaaacag ccctgggtcag agtgatgctc ttctcaaagc 8940
 caacgatcac caccaagaag gggaggcctt cggatagcaa cctcatgctc atcggaaccc 9000
 ctagtcttat ggccacgtcg agaccgagga gaaaggcaaa tggtgacgac aaaaggacgc 9060
 ttgtagccag ccaaaccctc gatcccaatt tttcatgct gaggaagagt gagacgaaag 9120

tcaagtgcac tgatatataa cctagcacca tgacaaccac gtcgagcggt tgagcgctct 9180
 tgataagatc aagagactct gtccaggtat cgtgcaccca ttgagcaagg ctgcgttttg 9240
 tgtgagccct ggcagccttc atgatccaca tctggcggtc catctcgatc aattgcgtct 9300
 cctgcaattt caggtcggca ctgttgttg ggatttcttg aacagcagcc acgagttccg 9360
 gcgcgctgct gtattccaca gagaaggcga aaactttatc tttcgaatag gcggttaaag 9420
 ggctcgacgt tgagggaagg tcaatcacag ataggttcac agggagggga gcaaggaatg 9480
 gtgaggctgc ttgagatgca accccatatg accccgggaa taccaaggtc attagtgcct 9540
 gatggttgaa atctccgaga acatctgcat ccccgctgaa gctctgccac ttccagccat 9600
 tctgtgggcc ggtgatcaag ctctgacttc ctctgaccaa agagccccat tctgctttat 9660
 caacgtttgc ggggccatgg aagaagctgt ctttgagtag tccaacgtat gtggtactag 9720
 ctagaatagc tatggtgcaa acggtatgga tcgggtgtag acacgccgtt ttggatagaa 9780
 attggagtgt ggaggtcaat gcccgatttc ccgagcgtag aggggtgctgc tgattcattg 9840
 attccctacc gcgaaagcga gagggtagca acgaagcgac catgctgaaa ggtctgtgct 9900
 acagcttgga gtggtaccta tagctaggta gtctctgaga aaagaatcta gtcagctctg 9960
 caaatgggga cggaaaagca ctccaattgg gaattagggc ttgagataaa gtgcatacct 10020
 ccaaaatcga atgagcaacc taatcggtta ggccgctagg tataatctgc cgtcgtagat 10080
 tggaggaagg ttgttcggcc caaggggttg ggagggacaa ctgaacagtt cctaggtacg 10140
 ggaaatgagt agaagaaaat aacaaatggc gcgcgcccct gaggtgagg cagcggaaag 10200
 attcgcttcc ttatccctgc atctggtcca cctttatgaa tggattcatg accggtgtca 10260
 actgctgcct aggggtataat tggttaagggg taccaagcaa aggatagtag gaccaattgc 10320
 actgaaaact agtatttgtg ctcataacta tgctcagttt ccaaggtttt tatgcataaa 10380
 tttatccttt attcgagaaa aaagaattct ggggacacca atcaattgcc ctgataccta 10440
 ggaatgtgaa ctccaagat tgttccgaaa gtaggcaaaa tgaccaataa gacagaacac 10500
 tacctaggta tagttatttt gtcatgccta gatccgacat acaaaggagc gtcctcttac 10560
 atagacgtcc tgtagacgt ttctaactctg actcgtattg tggtcctttt ttggtggggc 10620
 ggcaagctgc atcgatcacg cccggacgag gccacttcgt gaggaatgga aatatattgt 10680
 gcctacggag taatgcacca cgaaacacat tcttctcgaa acgactactt acgcagggat 10740
 gtatgggtat tattctgtcc acgaaaagcc agtgtcaacc ccccccccc ccccccccc 10800
 cggtatcatt tatctcagta aacagcaacc tgaacaagat acccaggtag acaagaagtc 10860

agtttggagt atagtgtata gactcgggaa catttttgtt ggacctccgt acgtgtctct 10920
 caaatcggcg tctctcggtc tttggatacc ttcggagtta cacggggctt tgttgccaag 10980
 gcttcaatat tcggcgcatg gattttcttt gtgcatgggt ctgagtgggg tgccgtaagg 11040
 tatggtattg ctcccgattg ggagttctga cagatgatca tgccgccttc cgaagtagaa 11100
 aaaagaggaa agggtcacat gctcatgatg atcgtttgct cgcgatgaat tgcgcttcct 11160
 gcatatattt tgtttgcttg tcttagtcaa ccgataatgc aaattttggg gatttgttat 11220
 tgttggaat tgaattacca actgcttaca ggaccacccc tgcgctcagg ccctcaacaa 11280
 accttgggac aggattaccc actaagcctt tccaagcttt tccaaggctt ttggattcgt 11340
 ttggtttgat agctcgtatg cgtatttcgc atctgtgtac ggagtatcgg attctgacag 11400
 cctccattat acccgaaaac tacctggccg gcctgacctg tttcgtcttg ttcgacgggt 11460
 tcccatcggc gttttgactc gggattatcg tgacgacaga caatgcctcc cgaaccggta 11520
 cctctaaggt attgccccga gcatagcatg gtggtccggg gtttcccatg ggcacagagc 11580
 gaatategtg tcacgtccaa gatgaaaaca aaccccgaac tatgaatcac gtgtcggggg 11640
 cagcttatgc atctatagct atgccaggga cctgtagact gttggaagac tatcaacgg 11700
 tttatcacca gggcgactga tatatcagtc aatgaaacaa cgttggaatg aacaataccc 11760
 ccgccgtaac cgcaaccgca accgcaaccg caaccgcaac cgcaatggca ggctcggctt 11820
 gctctaacac atccacgccc attgccatag ttggaatggg atgtcgattt gctggagatg 11880
 caacgagtc acagaagctt tgggaaatgg ttgaaagagg aggcagtgcc tggcttaagg 11940
 tccccctc gcgattcaat gtgagaggag tataccaccc gaatggcgaa agggtcgggt 12000
 ccgtgagtat ctaacatgca tgcatttata tcttgtttg aatatttgac acaagatttg 12060
 agcatcactg aagcttggtt actgactcca aggatgactg gatagaccca cgtaaagggt 12120
 ggacacttca tcgacgagga tcttgcctta tttgacgccg cgttcttcaa catgaccaca 12180
 gaggtcgcca gcgtatgatt atttcaattg atctaaccg ggacgcagag atctaattt 12240
 ggacagtga tggatccgca gtatcggctt atgcttgagg tggcttacga atcgctggag 12300
 agtggtatgt agtgtgggtc atcctcactg taagcaaacg tcaactgacca tcatccagcc 12360
 ggtatcacca tcgatggtat ggcaggctct aatacgtcgg tgtttggggg tgtcatgtac 12420
 cagactatc aggatcgtc caatcgtgac cccgagacag ttccgcgtta tttcataact 12480
 ggcaactcag gaacaatgct ttcgaaccgg atatcacact tctacgactt acgtggtccc 12540
 agcgtgacgg ttgacacggc ctgttcgacg acattgaccg cactgcactt ggcgtgccag 12600

agcttacgta ctggggagtc agatacagcc atcgttatcg gtgcaaactct tctgctcaat 12660
 cccgatgttt ttgttacgat gtcaaacctg gggtagagttt tccgaagaag attccagatc 12720
 gagagtcttg aactaagcaa tccttggtgc tcaatgacag atttttgtcc ccggatggta 12780
 tctcgtaactc ttttgatcct cgagcgaatg gatatggctg cggggaagga attgccgctc 12840
 tggtaataaa ggccctccct aacgcgttgc gagaccaaga ccctatccga gccgtcattc 12900
 gagagacagc gctgaaccag gatggcaaaa caccgcgaat tactgcgccg agtgatgtgg 12960
 cgcagaaaag tctgatccag gagtgttacg ataaggctgg gctagatatg tcgttgacct 13020
 cgtacgtgga ggcccacgga actggaacac caactgggtga ccccttgaa atctcagcaa 13080
 tttcagcagc ttttaaagga catcctctgc accttggtc tgtgaaagca aatattggcc 13140
 atacagaagc cgccagtggc ctggccagta taatcaaggt ggccttggcc ttggagaagg 13200
 gcttgattcc ccctaattgc cggttcctgc aaaagaacag caagctgatg cttgaccaaa 13260
 agaacatcaa ggtaaggctt tgcgcattcg cagattcagt tatatgttcc aaaggttaat 13320
 gtttcaaaga tccccatgtc tgctcaagac tggcctgtga aagatgggac tcgtcgcgca 13380
 tctgtcaata acttcggctt tgggtggttcg aatgctcacg tcattttgga atcatatgat 13440
 cgcgcattcat tggccctgcc agaggatcaa gtgcatgtca atggtaactc tgagcatggt 13500
 agggttgagg atggttccaa acagagccgc atatacgttg tgcgtgcaa ggacgagcaa 13560
 gcttgtcggc gaacgatagc aagcctgcga gactacatta aatccgtcgc tgacattgac 13620
 ggggaaccct tcctcgccag cctcgcctat acactaggct ctcgccgttc cattctgcca 13680
 tggacgtcag tgtatgtagc agacagcctt ggcggccttg tttctgccct cagcgatgag 13740
 tccaatcaac caaaacgagc gaatgagaaa gtacggctcg gatttgtatt caccggtcag 13800
 ggggcgcagt ggcatgcaat gggcagagag ctggtcaata cattcccagt attcaaacag 13860
 gcgattcttg aatgtgatgg ctacatcaag caactgggcg cgagttggaa ttttatgggt 13920
 aagttgcgag cccgggaaaa gtaatactgt atcaagcttg aggtactaac attcaattgc 13980
 acagaggagc tccaccgtga tgagctgacg actcgggtaa atgatgccga atacagtcta 14040
 ccactgtcaa ccgctatcca aattgcactt gtgcgtctcc tttggtcatt gggaattcgg 14100
 ccaacgggga taaccagtca ctcaagtgga gaggctgctg ctgcctacgc agctggggct 14160
 ttatccgcgc ggtcggccat tgggatcact tatatacgcg gtgtattgac cactaagccc 14220
 aagcccgcat tggcagccaa aggaggaatg atggcggttg gtcttggtcg cagtgaagacc 14280
 aatgtttaca tttcgcgtct caaccaggag gacggctgtg tgggtggttg atgtatcaac 14340

agtcaatgta gtgtgacggt gtcgggagat ttgggtgcaa tcgagaaact tgaaaagtgtg 14400
 ttacacgccg atggcatctt taccaggaaa ctgaaagtca ctgaagcctt ccattcaagc 14460
 cacatgcgac caatggcaga tgcctttggg gcgtcactga gagatctgtt caactcggat 14520
 aacaacaacg acaatcccaa tgctgacacc tcaaagggtg tattatattc atcacctaag 14580
 actggtagtc gcatgaccga tcttaaattg ctattggatc ccacacactg gatggatagt 14640
 atgctacagc cggtagagtt cgagtcctca ctccgcgaga tgtgctttga tcccaacacc 14700
 aaagagaaag ccgtcgatgt gattattgaa atagggcctc acggagcgct tgggtggtcca 14760
 atcaaccaag tcatgcagga tctgggtctg aaaggaacag atataaacta tctcagttgc 14820
 ctttctcgcg gcagaagctc gttggagaca atgtatcgtg ctgctacgga gttgataagc 14880
 aagggttatg ggctcaaaat ggacgctata aactttcctc atggaagaaa agagcccaga 14940
 gtgaaggtagc tgagcgattt gccggcgtag ccgtggaatc accaaacccg ttattggaga 15000
 gagcctcgcg gcagtcgtga gtccaaacag agaaccatc cgcctcacac tttgataggc 15060
 tcacgggaat ctctctctcc tcatttcgcg cctaaatgga aacatgttct ccgtctgtca 15120
 gatattccat ggatacgaga tcacgtcggt gggtcgagca tcatctttcc gggagctggc 15180
 ttcatcagca tggccatcga ggggttttca caagtctgcc caccagttgc gggggctagc 15240
 atcaactaca acttgctga cgttgaactc gcgcaggctc tcataatacc cgctgatgca 15300
 gaagcagagg ttgacctgcg cctaacgac cgttcatgtg aggaaaggc cctcggcaca 15360
 aagaactggc atcaattttc tgtgcactca atttcgggcg aaaataatac ctggacagaa 15420
 cactgcaccg gattaatacg ttcggagagc gaaagaagcc accttgactg ttcaactgtg 15480
 gaagcctcac gcaggttgaa tctaggctca gataaccgga gcattgatcc caacgatctc 15540
 tgggagtcct tacacgcgaa tgggatatgc cacggacca tttttcagaa cattcagcga 15600
 attcaaaaaca atggacaggg ctggttttgc agattttcca ttgctgacac tgcctcggct 15660
 atgcctcact cgtacgagaa tcgacacatc gtccatccta ctactctgga ctcggtgatc 15720
 caggcggcat acacggtgtt accctacgcg ggaacacgta tgaaaacggc catggtacca 15780
 aggaggctaa gaaatgtcaa aatatacctc agcctggctg acttggaggc tggatgatgct 15840
 ctggacgcac aggccagcat caaggatcgc aactctcaat ctttctctac cgacttggca 15900
 gtgtttgatg actatgatag cggttcttct ccctcggacg gaatcccagt catagagatt 15960
 gaaggccttg tttccagtc ggttggaaagc agcttctctg accaaaagtc agactccaac 16020
 gacacagaaa atgcctgcag ctctgggtt tgggccctg acatcagctt gggtagctcc 16080

acttggtca aagaaaagtt gagcactgag gctgagacga aagaaacgga actcatgatg 16140
 gacctccgaa gatgcacgat caactttata caggaggctg tcaactgattt gacaaattct 16200
 gatatccaac atctggatgg ccaccttcag aagtatttcg attggatgaa tgtccaattg 16260
 gaccttgca gacaaaacaa gctcagccca gccagttgag actggctaag tgacgatgct 16320
 gagcagaaga aatgcctaca ggccagagtc gctggagaaa gcgtcaatgg cgagatgatt 16380
 tctcgtctag gacctcagtt aatagcaatg ctacgccgag aaacagagcc acttgagttg 16440
 atgatgcaag atcagctgct aagcagatac tacgtcaacg caatcaaattg gagccgatca 16500
 aacgcacaag ccagcgagct gatccgactt tgcgcccaca agaaccgagc ttctcgattt 16560
 ttggagattg gcggaggcac gggcggtctg acaaagctta ttgtcaatgc attgggaaac 16620
 accaagccga tcgatcgta tgacttcacc gatgtgtctg ccgggttttt cgagtcggcg 16680
 cgtgagcaat ttgcggattg gcaagacgtg atgactttca aaaaattgga tattgaaagc 16740
 gatcccgagc aacaagggtt tgaatgtgcc acctacgatg tggctgtggc ttgccaggtc 16800
 ctgcatgcaa ctcgatgcat gaaacgaaca ctgagtaacg ttcgaaaatt gctcaagcct 16860
 gggggcaact tgattttggt tgagactacc agggatcagc tcgatttggt cttaccttc 16920
 ggactgttgc caggttggtg gctcagtgag gagcctgagc ggaagtcgac gccatcgctc 16980
 actaccgatc tttggaacac catgttggac acgagcggtt tcaacgggtg ggaattggag 17040
 gttcgtgatt gtgaagacga tgagttttac atgatcagca caatgctatc gacggctaga 17100
 aaagagaata caaccccga tacagtggca gaatcggagg tgcttttgct gcacggagcg 17160
 ctccgacctc cttcatcttg gctggaaagt ctccaggcag caatttgtga aaagaccagt 17220
 tctagcccat cgatcaacgc tctgggcgag gtagatacca ctggaaggac atgcattttt 17280
 cttggggaaa tggagtcttc gctccttgga gaggtgggaa gcgagacctt caaatccatc 17340
 accgcgatgc tgaataactg caacgcactt ctctgggtgt ctagaggagc agccatgagc 17400
 tccgaggatc catggaaagc tctacatatt ggtctgctgc gtaccatccg caacgaaaat 17460
 aacgggaagg aatatgtatc gttggatctc gatccttctc gaaacgcata caccacgag 17520
 tccctgtatg ctatctgcaa tatcttcaat ggccgcctcg gcgaccttc cgaagacaag 17580
 gagtttgaat ttgcagagag aaacggcgct atccacgtac cgcgactttt caatgaccgc 17640
 cactggaagg accaagaagc ggttgaggtc aactgcagc cgttcgagca acccgggcgt 17700
 cgtctgcgga tggaggttga gacgccaggc ctcttagact ccctgcaatt tcgagacgac 17760
 gaaggacgtg aaggcaagga tcttccgat gattgggtag aaatcgaacc caaagctttc 17820

ggtctcaatt ttcgggatgt catggttgcc atgggtcaat tggaggccaa ccgtgtgatg 17880
 ggcttcgaat gcgccggagt gatcaciaag ctccggtggag ctgctgccgc tagccaaggc 17940
 ctcagattag gggaccgcgt atgtgcacta ctgaaaggcc attgggcgac cagaacacag 18000
 acgccgtaca ctaatgtcgt ccgtattccg gacgaaatgg gcttcccaga agccgcttcg 18060
 gtccccctgg ctttactac cgcatatatt gcgctttata ccacggcaaa gctacgacga 18120
 ggcgaaagag tcttgatcca cagtggagct ggaggcgctg gtcaagcagc gatcattttg 18180
 tcccagcttg cgggtgccga ggtcttcgtc acagcgggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18240
 gtcggcgata aattcggcat caatccgat catatcttct cgagcaggaa tgacttattc 18300
 gtcgacggca tcaaagccta cacgggcgga cttggcgctt atgtcgttct aaactcattg 18360
 gcaggtcaac tcctccaagc aagctttgac tgcattggccg aattcggcag atttggtgag 18420
 attggaaaaa aggacctgga gcaaaacagc agacttgaca tgctgccatt caccggggac 18480
 gtctctttca catcaattga tcttctctcg tggcaaagag ccaaagtga agaagtatcc 18540
 gaagcggtga accatgtcac aaaactcctc gagacaaaag cgattggctt gattggtcca 18600
 atccagcagc actccttgct aaacatcgag aaggccttcc gtacgatgca gattggtcag 18660
 catgttggca aagttgtggt caatgtatct ggggacgaac tggctccagt cggcgatgga 18720
 gggttctcgc tgaagctgaa gcctgacagt tcttacctag ttgctggtgg gctgggggga 18780
 attggaaagc agatctgtca gtggcttggt gatcatggcg cgaagcactt gattatccta 18840
 tcgagaagtg caaaggccag tccattcata accagcttgc aaaatcaaca gtgcgctgtc 18900
 tatctacacg catgtgacat ctcagatcaa gatcaggtca ccaaggtgct ccggttggtc 18960
 gaagaagcac atgcaccgc aattcgaggt atcatacaag gtgccatggt tctcaaggac 19020
 gcgcttctat cgcgaatgac attggatgaa tttaatgcag caacacgccc aaaagtacag 19080
 ggtagttggt atcttcacaa gatcgcacag gatgttgact tcttcgtgat gctctcatcc 19140
 cttgttgggg tcatgggtgg ggcaggccag gccaatcag cagctgctgg tgcattccag 19200
 gacgcacttg cgcaccaccg gagagcccat ggcatgccgg ctgtcaccat tgacttgggc 19260
 atgggtcaagt ctgttgata cgtggctgaa actggccgtg gtgtggccga ccggctcgtc 19320
 agaatagggtt acaagcctat gcatgaaaag gacgtcatgg atgtgttgga gaaggcaatc 19380
 ctgtgttctt cccctcaatt tccatcacct cccgcagctg tggttacagg aatcaacaca 19440
 tccccgggtg ctactggac cgaggcaaac tggatacagg aacagcggtt tgtgggactt 19500
 aaataccgcc aagtccttca tgcagaccaa tcctttgtct cttcgcataa aaaaggacca 19560

gatggcgtgc gggcccaact aagcagggtc acctctcacg acgaggccat ttctatcgtc 19620
ctcaaagcaa tgacggaaaa gctgatgcga atgtttggtc tggcagaaga cgacatgtcc 19680
tcgtccaaaa acctggcagg tctcggcgta gactcactcg tcgccattga acttcgaaac 19740
tggatcacat ctgaaatcca tgttgatgtg tcgatctttg agctcatgaa tggtaacacc 19800
atcgccggcc tcgtcgagtt agttgtggcg aaatgcagtt aagttgaagg gttcagtga 19860
gccttttgtc tggccaagcg ggtatagctc gacggaggta tagtacgaag gagcatagcg 19920
gccatggtct gaagcctgaa tccaatctga atcgagcctg ggctgagcct gactatttaa 19980
tgcctgactt ctggatagca gtaaataagag atacctgaaa taccattaca gtggccctga 20040
gaagcaacaa agtacacatg tgcactcggt ctcgaagtcg gaagagtga tgctttttat 20100
actaccaggg aagctgtctt agcacctcgg aggcttgact gtcaaaagtt ctctcttttt 20160
ctctccatta tgattcccgc aagccttgta aatgcgcgtt gaacggtcga aaggcgttgg 20220
cacgggcagt gggtacagat tgtggatatg tagtcggaag gcgggaggga gtacttgtgt 20280
ccacgtcgtt gcgccgtcct ctctttcgcc tagtcgggga tgttgagtag gaacatcaag 20340
acttaacaga gcctaagccc tcgtcatcgt aagcgccagt caacgcctga gagaatgggg 20400
agatcgggtga ttgtaccggg agaaaagctt cattactgcc gacttccta cgtggcgggtg 20460
tagctggcgg tatagaagca gatggccgct ctgcgtagca ggaatacaca ctctctccct 20520
tctctctctc tgtgtttctg tctctcgac atagccaaag tctacaccac gttcgattac 20580
aaagaaggca tcacaatcga ataaaatgcg ttttatttta ctaacctact cgactaatac 20640
agcacctagt ttctctggga cggaaactat tggaataagc ctggggacgg atgcatattt 20700
gttttagttt gcgtgttata tcttagcacc ggtcatgagg gagcgggatg tcctcgttgc 20760
gccggcgtag catgagcttt gtggttggat gcatacgaac gctaaaagcg tgacggtagt 20820
atttgtcatc gtctcctggt acaggcttca catcactctg aatcagtata tgagcgagga 20880
gaatcttgat ttccttcgag gcgaagaacc gcccgggaca agcgcgtggg ttccagccga 20940
agccgatgtg atcaccgttg gtattctcca attgagcggg gaaggccttg tctggatcct 21000
cgcgcatgcg cataaatcgg tagggatcat aattttcggg gttttccac acatcagggt 21060
tgttcatgcg gtctgcagcc acagcgcca actcgccctt gggaatgaag aggccattgg 21120
atagagtgat gtctctgaga gcggtactgc gcatagtggc gcactcgacc ggcttgattc 21180
gctgcgtctc tttcatgcag ctgtcgagga gcttcagctt gaacagagag gcaggcgtcc 21240
agcccccttc tccgattaca gtgcggatct cttggcggag aggctgaata aggtctgggt 21300

gcctggcaat gtccacaagg gcaccgacga aaagatccgt cgaggcgtag atgccggcga 21360
 aatccatagc gagctgagca cccgccacat cgtaccagcg gccgtcggcg gtgtcttcaa 21420
 accattgcat ggtatcgacg tactggggcg gctgcacgcc cttcgctaca catgcggcct 21480
 tttcagcacg tcgtcgtga atctcaggat caatgatctt tcgtgcgcgg cgcaacttgg 21540
 cacgcaattt gcgtccttgc ggttgaaacc agtgagcgag cggtcgcagt agcatgggcc 21600
 atacgcgaag ttggcgagct tgtaccgcca cactcacggc atggttcttt gcaatatcca 21660
 gccactcctc attgtggcag attttgtcgc cgaccataat gagtgtgact gttcgtgtga 21720
 caaggtccaa tccattggaa tagacaggtg cggtttgcca ctctagtata ttcgcggtat 21780
 gtcagccaga ggctcaatgc tcaagacaga aaaattgaca cttaccctcg cttttaccga 21840
 acaacttggc aatagtagcg tcggccaagg tagccaatgg ctttgtgtac ttgggggctt 21900
 gggtttgtaa ctggttcaaa acaactttgt tgacaagatg tgcattcctg cagatttctt 21960
 tgaaccgctc gaatccaggg agatgagagt gaaagtccta tacattcattc agaattcttag 22020
 agacgtcatt gatttacaac aatggaaaat tcagaggtca tacatccgcc aaaaacttgt 22080
 acatgcacat atctttgatt ttccgaaact cgtcggccat ggacgatggg aggatggtgc 22140
 aatagccgga atcaacaatg aagcgcaggg gcttgtcgtt tttcgagaac caagcttcga 22200
 tccagctcgg accatacgta tcgaagtcct gcctagccct catggtcgtc aactcccacc 22260
 attttttggg attatagact tgcagttcgg actggcgccc ccgcaaacgg taggcgatga 22320
 gactaagaag cactgcgacc gccacaaggg cttgaggggt cgatacccat tggtagcatt 22380
 cgacggctcag aagaacctgg ccgagcattg cgtgagacag ataggacctc tgcacaccag 22440
 tggaagaaga gaaagagcga agaattgagag cgctgcgacg gtttataatc gaataacagc 22500
 actaatgctt ctgggatttt gtggccgaga gcactcttcc agtcaacctt gaaaaaaaaa 22560
 aaaccccccc cccaatcgaa gtttacctgg atggggcagt tcggttggtt cctttaggag 22620
 cagcttcacc gagcagcaca agaacaatcc gaggtaaaaa ctcggtttca ccttgataca 22680
 gccaatgat attcacgttt gattcattca gcctcgtgtg accgaataac gccgtatgga 22740
 ggaatggcta ttcgtgcacc gaatgacgcc gggagggttt gctaggtgcc gagcttgcatt 22800
 tgctgggaag tgggggcatt tgagtactag aatggatctt gaaattgtcc gaatctagat 22860
 gagtactgat acgtgcaagt aaatataacg acggtatcgg ttgcaaggcc ggcttggtcg 22920
 ctgagagatt caactctgcg attctgtaag aacaaatgtt gtgcccggca tgcagtgaga 22980
 agatctactg acgcaagaca aggtttaatc ccaatcctat cgccccaaaa caggatcagc 23040

agttatggat caagccaact atccaaacga gccaattgtg gtagtgggaa gcggttgtcg 23100
 gtttccaggt ggtgtcaaca caccatcaaa actttgggag ctgctcaaag agccccggga 23160
 tgtacagacc aagatcccta aggagagatt tgacgtcgat acattttaca gccccgatgg 23220
 cactcacccc gggcgacga acgcaccctt tgcatacttg ctgcaggagg atctacgcgg 23280
 ttttgatgcc tctttcttca acatccaagc tggagaggcc gaaacgattg acccacagca 23340
 aaggctgctg ctggagacgg tctatgaagc tgtatccaac gcaggcctac ggatccaagg 23400
 ccttcaagga tcctctactg ctgtgtacgt cggtatgatg acgcatgact atgagactat 23460
 cgtgacgcgt gaattggata gtattcctac atactctgcc acgggggtag ctgtcagtgt 23520
 ggccctccaac cgtgtatcat acttcttcga ctggcatggg ccgagtgtga gtgccactca 23580
 ttgagcgagc ccgacttcgt caagtgtctga cagattcctg actgattctg cagatgacga 23640
 tcgacacagc ctgtagttca tccttagctg ccgtgcatct ggccgtccaa cagcttagaa 23700
 cgggcgagag taccatggcg gttgcagccg gtgcgaatct gatattgggc cccatgacct 23760
 ttgtaatgga gagcaaattg aacatgctgt cccccaatgg tagatctcga atgtgggatg 23820
 ctgctgccga tggatatgcc agaggagtaa gttgacaatg catcaattcc tttcaaaaaa 23880
 agcaagatgg cactgacctc ctgtaactgc tttttaggaa ggtgtttgct ctattgtcct 23940
 gaaaacgctg agccaggcac tgcgcgacgg ggacagtatc gagtgtgtta tccgagagac 24000
 cggtatcaac caagatggcc gaacgacagg tatcacaatg ccaaaccata gcgcacaaga 24060
 agccctcatt cgggccacat atgccaaggc tggctttgat attaccaacc cccaggaacg 24120
 ctgccagttc tttgaagccc atggtaagtg gtattccctg gaagtatcag ccttatggaa 24180
 gttgcagaaa gtctctctct ccctaacacg aagatcccag gaactggtac accagccggt 24240
 gaccacaggg aagctgaggg tattgcaaca gccttcttcg gacacaagga tggacaatc 24300
 gacagcgacg gcgagaaaga tgagcttttt gtcggcagca tcaagacagt tctcggtcac 24360
 acggaaggca ctgctggtat tgcgggctta atgaaggcat cgtttgctgt acgaaatggc 24420
 gtgatcccg ccaacctgct gtttgagaag atcagtcctc gtgtcgctcc gttctatacg 24480
 cacttgaaaa ttgcaacgga ggccacagaa tggccgattg ttgcgcccgg gcagcctcgc 24540
 agagtcagcg ttaattcatt tggtaaggat tcaactgcac ttcttgagaa cgaaagtga 24600
 gttagctaaa catataaaca catcaggatt tggtggtaca aatgccccatg ctattatcga 24660
 agagtatatg gctcctccac acaagccgac agcagtggta acagaggtga cctcagatgc 24720
 agatgcatgc agcttgcccc ttgtgctttc atcgaagtcg cagcgctcca tgaaggcaac 24780

gctagaaaat atgctccaat ttctggaaac gcatgatgac gtggacatgc atgatatcgc 24840
 atatacctta cttgagaaac ggtctatctt gcccttccgt cgtgcgattg cagcacacaa 24900
 caaggaagta gcccgcgcgg cactggaggc tgccatcgcg gacggtgagg tcgtcaccga 24960
 cttccgcacc gacgcgaatg acaaccctcg cgtactaggt gtctttactg gccaaaggtgc 25020
 acagtggccg ggcatgctga agaagctcat ggtgggtatg ccatttgtga gaggcattct 25080
 cgaagagctg gataattcac tgcaaacact gcctgaaaag tatcggccta cgtggacact 25140
 gtatgaccag ctcatgcttg aaggggatgc ctcaaacgtc agactcgcca gcttctccca 25200
 gcctctatgc tgcgccgtac aaatcgttct ggtccgactt ctgctgcag ctggtatcga 25260
 gttcagtga attgtcggcc acagttcagg tgagattgcc tgtgcctttg cggcaggatt 25320
 catcagtgcc actcaagcta tccgtattgc gcatctcggt ggagtttgtt ccgcggagca 25380
 tgcctcttct ccaagcggcc agacaggcgc tatgctagcg gcaggtatgt cgtacgatga 25440
 cgcaaaggaa ctatgcgagc tcgaagcctt tgagggtcgg gtctgcgtcg ccgctagcaa 25500
 ttcaccggat agtgtgacct tctccggcga catggatgct atccagcacg ttgaaggtgt 25560
 cttggaggat gaatccactt ttgccagaat cttgagagtt gacaaggcct accattcgca 25620
 tcacatgcac ccatgcgcag ctccatatgt caaggcattg ctggagtgcg actgtgctgt 25680
 tgccgatggc caaggtaacg atagtgttgc ttggttctct gccgtccacg agaccagcaa 25740
 gcaaatgact gtacaggatg tgatgcccgc ttattggaaa gacaatctcg tctctccggt 25800
 cttgttctcg caggctgtgc agaaagcagt catcactcat cgtctaactg acgtcgccat 25860
 cgaaattggc gccaccctg ctctcaaggg tccgtgtcta gccaccatca aggatgctct 25920
 tgccggtgtg gagctgccgt ataccgggtg cttggcacga aacgttgacg atgtggacgc 25980
 ttttgctgga ggtctgggat acatttgga gcgtttcgga gttcggagta tcgacgccga 26040
 gggcttcgta caacaagtcc ggcccgatcg tgccgttcaa aacctgtcaa agtcattgcc 26100
 cacatactct tgggatcata ctcgtaata ctgggcagaa tctcgctcca cccgccagca 26160
 tcttcgtgga ggtgcgcccc atcttctgct tggaagctt tcttcttaca gcacagcatc 26220
 gaccttcag tggacaaact tcatcaggcc ccgggatctg gaatggctcg acggtcatgc 26280
 gctacaaggc cagactgtgt tccccgtgc tgggtacata attatggcca tggaaagctgc 26340
 catgaagggt gctgggtgagc gtgccgcca agttcagctc ctggaaatct tggacatgag 26400
 catcaacaaa gccatcgtgt ttgaagatga aaacacctcc gtggagctga acttgacagc 26460
 cgaagtcacc agtgacaatg atgcggatgg ccaagtcacg gtcaaatttg ttattgattc 26520

ctgtctggca aaggagagtg agctttcgac atccgcaaaa ggccaaatcg tcataaccct 26580
tggcgaggca tcaccgtcat cgcagctttt gccgccacct gaggaagagt acccccagat 26640
gaacaatgtc aacatcgatt tcttctatcg ggaacttgac ctccttgggt atgactacag 26700
caaagacttc cgtcgtttgc agaccatgag aagggccgac tccaaagcta gcggcacctt 26760
ggctttcctt ccacttaagg atgaattgcg caatgagccc ctcttgctcc acccagcgcc 26820
cctggacatc gcgttccaga ctgtcattgg agcgtattcc tctccaggag atcgtcgcct 26880
acgctcattg tacgtgccta ctacgttga cagagtgact ctgattccat cgctctgtat 26940
atcggcgggt aattctggtg aaaccgagct tgcgtttgac acaatcaaca cacacgacaa 27000
gggtgatttc ctgagcggcg acatcacggt gtacgattcg accaagacaa cgcttttcca 27060
agttgataac attgtcttta agcctttctc tccccgact gcttcgaccg accaccgaat 27120
cttcgcaaag tgggtctggg gacccctcac gcccgaaaaa ctgctggagg accctgcgac 27180
gttgatcata gctcgggaca aggaggacat tctgaccatc gagcgaatcg tttacttcta 27240
catcaaatcc ttcctagccc agataacccc cgacgaccgt caaatgccg acctccattc 27300
ccagaagtac attgaatggt gtgaccaggt tcaggccgat gctcgggctg gccaccatca 27360
gtggtaccag gagtcttggg aggaggacac ttctgttcac attgagcaaa tgtgtgaaag 27420
gtacacccaa agctgttccg tgttttttca ttcttttata ttaacctttt acttgaagca 27480
actcgtccca cccacatgtg cgcctgatcc aaagggtagg caaagaatta atttcaattg 27540
ttcgcgggaa cggggatcct ttggatatca tgaaccgca tgggttggtc accgagtact 27600
ataccaacaa gctcgccttt ggctcagcaa tacacgtcgt tcaggatctg gttagccaaa 27660
ttgctcatcg ctaccaatcc attgatatcc ttgagatcgg taagtcgaat ctgaaatgta 27720
agtaactagg cagtttgcta atctgtcgtt cgcttttttag gcttgggtac aggcatcgcc 27780
acgaagcgcg ttcttgcac acctcaactt ggtttcaaca gttacacttg cactgacatc 27840
tcggcggatg ttattggcaa ggcccgtaga caactttccg aattcgacgg tctcatgcag 27900
tttgaggcac tagacatcaa cagaagccca gcagagcaag gattcaagcc tcactcctac 27960
gatctgatta ttgcatccga tgtcctccat gccagctcca acttcgagga aaaattggct 28020
cacataaggt ccttgcctca gccgggtggt cacttggtta ctttcgggggt caccatcgc 28080
gagcctgctc gcctcgcctt catctctggg cttttcgtg atcgatggac tggagaagac 28140
gaaactcgtg ctttgagtgc ctcgggggtcc gttgaccaat gggagcatac cctcaagaga 28200
gttgggttct ctggcgtcga tagtcggaca ctgatcgag aggatgattt gatcccgtct 28260

gtcttcagta cacatgctgt ggatgccacc gttgagcgtt tgtatgatcc actttctgct 28320
 ccattgaagg actcataccc gccattagt gttatcgggtg gcgaatcgac aaaaaccgaa 28380
 cgcattttga acgacatgaa agctgcccta ccgcatagac acatccactc cgtcaagcgg 28440
 ctggaaagtgt ttctcgacga cccggccttg cagcctaagt cgacttttgt catcctctcg 28500
 gaacttgatg atgaagtgtt ttgcaacctt gaagaggaca agtttgaggc agtcaagtct 28560
 cttctcttct acgccggacg catgatgtgg ctgacagaga atgcctggat tgatcatccc 28620
 caccaggcca gcaccatcgg aatgttgagg acaatcaagc tcgagaacct tgacttggga 28680
 acgcacgtct tcgatgtcga tactgtggag aacctagaca ccaaattctt cgttgagcaa 28740
 cttttgcgct tcgaggagag cgatgatcag cttttggaat caataacatg gactcatgag 28800
 cccgaagtgt actggtgcaa gggtcgtgcc tgggtccctc gtttgaagca ggatattgct 28860
 aggaacgacc gtatgaactc gtctcgtcgt ccaattttcg gtaactttaa ttcgtccaag 28920
 acggccattg cactgaaaga ggcgagggga gcaccccat cgatgtacta tcttgagtca 28980
 accgagacgt gtgattcgtt agaagacgct cgtcatgctg gaaaagcaac tgttcgtgtt 29040
 cgctacgctc ttccccaggc aattcgcgtg ggccatctcg gatacttcca tgcgtgcag 29100
 ggcagtattc tggagaatac atgtgagggt cctgtagtcg ccctggctga gaagaatgga 29160
 tctatactgc atgtaccgag aaactacatg catagtctgc ccgataacat ggcggaaggc 29220
 gaggatagtt ccttcttggt gtccacagct gcagccctcc ttgccgaaac aattctctct 29280
 agcgtcagtt cctttggctc tgatgcatca attctgatta tggagccccc aatcttctgc 29340
 gtcaaagcaa ttctggagtc ggccaaaacc tacggtgttc aggttcattt ggcaacaact 29400
 ctgtccgacg tcaaaactat tccggctcct tggatccgat tacatgcca ggaaaccgac 29460
 gctcggctga aacacagcct gccgacaaac atgatggcat tctttgactt gtctaccgac 29520
 cggactgctg ccgggataac caaccgtttg gccaaagtgc taccaccag ttgcttcatt 29580
 tacagtgggt actatcttat ccgaagtaca gcttccacat acaaagttag tcatgttgag 29640
 gatattccaa tctcagacga ctctgtggca atggcaaaaa ataccgtctc tgcgtcgact 29700
 gtcgacgaca ctgagaaagt tattacagcc acacaaattc tcttgccctgg tcagctctct 29760
 gtcaaccaca atgaccaacg cttcaatctg gccaccgtca tcgactggaa ggaaaatgag 29820
 gtgtccgcta ggatttgccc catcgactct ggtaacttat ttccaacaa gaagacgtat 29880
 ttgcttggtg gtcttaccgg ggaccttggt cgctctctct gtcgctggat gatcttgcat 29940
 ggcgccccgc atgttgtgct cactagccgg aaccctcgac ttgatcccaa atggatcgcc 30000

aacatggagg cacttggtgg tgacatcacc gttctgtcaa tgtaagtga ttgatatac 30060
 atcacacctt gctaccacat cctcgtttac ttatccaatt actttcttta gggatgttgc 30120
 caatgaggat tcagtcgatg ctggccttgg caagcttgtc gatatgaagt tgccacctgt 30180
 tgccggcatc gcgttcgggc ctttgggtgt gcaggatgtc atgctgaaga acatggacca 30240
 ccagatgatg gacatggtgt tgaagcccaa ggtacaagga gcacgcattc ttcatgaacg 30300
 gttctccgaa cagacgggca gcaaggcgtc cgacttcttc atcatgtttt cgtccattgt 30360
 tgcagttatt ggcaatcctg gccagtccaa ctatggcgtc gcgaatgcct acctacaggc 30420
 tctggcccag caacggtgcg ccagaggatt ggcggtatct tctaccctg aattatcatg 30480
 catcgacgtc aagttactaa cgcacaacca cagggatcaa ccatcgatat tggtgccgtt 30540
 tacggtgtag ggtttgtcac gagggccgag atggaggagg actttgatgc tatccgtttc 30600
 atgtttgact cagttgaaga gcatgagctg cacacgcttt tcgccgaagc ggtcgtgtct 30660
 gaccagcgtg cccggcagca accacagcgc aagacggtca ttgacatggc ggaccttgag 30720
 cttaccacgg gtatcccaga tcttgaccct gcgcttcaag atcgaattat ttacttcaac 30780
 gaccctcgtt tcggaaactt caaaattccc ggtcaacgcg gagacggtgg cgacaatgga 30840
 tcagggtcta aaggctccat tgccgaccag ctcaaacaag caacaacttt agaccaagtt 30900
 cggcaaatac tgattggtaa gttatctctc atgcgtttcc tgatatcgag ttcaaactaa 30960
 caaagttgca gatggtctat ctgagaaact ccgtgttacc ctccaagttt cggacgggga 31020
 gagcgtggac ccaaccattc ctctcattga tcaagggtgc gactccttgg gtgcagtgac 31080
 tgtcggctca tggttctcaa agcaactcta ccttgacctc ccactcttga gggacttgg 31140
 cgggtccttct gtcgtgatc ttgccgacga cgcggccacc cgactcccag ctacatccat 31200
 tccgtgctg ttgcaaattg gtgattccac gggaacctcg gacagcgggg cttctccgac 31260
 accaacagac agccatgatg aagcaagctc tgctaccagc acagatgcgt cgtcagccga 31320
 agaggatgaa gagcaagagg acgataatga gcaggaggc cgtaagattc ttcgtcgcga 31380
 gaggttgtcc cttggccagg agtatctctg gaggcagcaa caaatggtaa aagatcatac 31440
 catcttcaac aacactattg gcatgttcat gaagggtacc attgacctcg accggttgag 31500
 gcgggctctg aaagcctcat tgcgccgtca cgagatcttc cgtacgtgct ttgttactgg 31560
 cgatgactat agcagcgatt taaatgggtc cgtccaagtg gttctcaaga acccgagaa 31620
 cagagtgcac tttgttcagg tgaacaacgc tgcggaggca gaggaagagt accggaaact 31680
 cgagaagaca aactatagca tctccacagg tgacactctc agactcgttg atttctactg 31740

gggcacagat gaccacctgt tggtaatcgg ctaccacaga ttagttgggtg atggctcaac 31800
 aacagaaaac ctgttcaatg agatcgggca gatttacagc ggggtgaaaa tgcagcgacc 31860
 atcgacccaa ttctctgac tagccgtcca acagcgggaa aacctggaaa atgggcgaat 31920
 gggggacgat atcgcgttct ggaagtccat gcatagcaaa gtctcgtcat ctgcgccaac 31980
 cgtgcttccc atcatgaatc tgatcaatga ccctgctgcc aattcagagc agcagcaaat 32040
 acagccattc acgtggcagc agtatgaagc aattgctcgt ttagatccca tggtcgcctt 32100
 ccgaatcaaa gagcggagcc gcaagcacia ggcaaccccc atgcagttct acctggccgc 32160
 ctaccacgtt ttgttggcgc gtcttaccgg cagcaaagac ataaccatcg gcctcgccga 32220
 aaccaaccga tccaccatgg aagaaatttc ggcatgggc ttttctgcta acgtgcttcc 32280
 cctgcgcttt gatgagttcg tcggcagcaa gacattcggc gagcaccttg tagccaccaa 32340
 ggacagtgtg cgtgaggcca tgcaacacgc gcgggtgccg tatggcgtca tctcgcactg 32400
 tctaggcctg aatctcccta cctcaggcga ggaacccaag actcagacac acgccccctt 32460
 gtccaggct gtctttgatt acaagcaggg tcaagcggag agtggctcaa ttggcaatgc 32520
 caaatgacg agtgttctcg ctcccgctga gcgcactcct tatgacatcg ttctcgagat 32580
 gtgggatgac cctaccaagg acccactcat tcatgtcaaa cttcagagct cgctgtatgg 32640
 ccctgagcac gctcaggcct ttgtagacca cttttcttca atcctcacta tgttctcgat 32700
 gaacccggct ctgaagttgg cctagatcgt tcagcgccgt gaattcagat gtgtggtttg 32760
 agtgttggtc atgataaaga tggattagaa attggcaata gagcagatgg caaatctatc 32820
 ctgaattcgg cgtcaattga cacacgcata ttcattaca aatagcgaat tcgtcttgta 32880
 tctttgtcaa aattacttct accttcgttg ctcttcttta ttgcagcaat cgtaacatca 32940
 agttagatag cgcggttcag agtaccgtaa cggtgataaa tatacctcgg tagcgcgttt 33000
 cgaaagactc tgtgaggaag gtgaaacctc caaggcttgg aattgatttc aatccatcct 33060
 gtatataaat tcgacgccat tgcaaatagt tccatagtta ctggtttagt gccttgttgt 33120
 ggtgatcgag tggttttaga tgtctgtcat gcctgttcag aacgagcctt ccatgatcta 33180
 tccaaaatat gttcacgaaa tatttatgag atggtcgcga ccactataac taaatcacc 33240
 ttggaagggtg agcattcaaa ccgtgtaaga ttagaactat tcaaatttgt tcagtaaaaa 33300
 tgtggtatgg actaggcatg agagccagag ccttgctata taccctgttg tctcacctag 33360
 acaaatgaac ctgacatctt gaccttttga tatagctgtt ggaagcgctt gaccgtctcc 33420
 tggacatcac tcggtctgtt gggaaaatta tgctttccct gaaactcgag tacatctgca 33480

ttctgaggca ggtaatgtgt ttcaaccatc tgtctcgacc cttggagagc aaaatcttga 33540
cgaccgtgaa gatgcagtgt cggcacgttg attattagct tgctgctgctc gtcttgccgc 33600
tcggctctca tgtaatctct ggcttcatcg ctatagaaac agcaaatcaa aacagcaatg 33660
ctcattttcg gaaaccatgg cagttttccc atttgctgtt gatggagcag caaagtggcg 33720
accaatgcgc cctcagagaa ggccactatg ccgacaatgg gtgcctgtgg gttagttata 33780
gaccaatctt ggacgggtctt ttgcacaggc ccgatcacag ccgctactct atcgcccacc 33840
gtgggggttg tcgtgtttgt aacggcgctca tgatgctttt ggaaccagggt gtagtatgga 33900
cccatgcctt ggaagacagg aagcacgccg ggtccggggc tggagctaaa cggcgcggtc 33960
gcatatacga attcaaactc gtttttcaac gccacgcgca gtttagagat ctggacgcgg 34020
aatatggctg ctgagcaccg ggccaccgtg atgcataaga gagcttttct cggtttgcct 34080
ggcgagaaat ctgtaatcct cgctggactc attttctctt gtggtgtgag ctgtgacttc 34140
gtctgttctg gggaatttgt tagtcattac tgacaaggaa ataacaacga cgtagtattg 34200
atc 34203

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (9)

<223> i

<400> 3

gayacngcnt gyasttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (8)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (15)

<223> i

<400> 4

tcnccnknrc wgtgncc

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 5

gcatgttcaa tttgctctc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 6

ctggatcaga cttttctgc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

gtcgcagtag catgggcc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 8

gtcagagtga tgctcttctc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 9

gttgagagga ttgtgagggc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 10

ttgcttgtgt tggattgtc

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 11

catggtactc tcgcccgttc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 12

ctccccagta cgtaagctc

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 13

ccataatgag tgtgactgtt c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 14

gaacatctgc atccccgtc

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 15

ggaaggcaaa gaaagtgtac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 16

agattcattg ctgttgcat c

21

<210> 17

<211> 722

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 17

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg gcttgttcgc tcagagattc 60
aactctgcga ttctgtttaa tcccaatcct atcgcccaaa aacaggatca gcagttatgg 120

atcaagccaa ctatccaaac gagccaattg tggtagtggg aagcggttgt cggtttccag 180
 gtggtgtcaa cacaccatca aaactttggg agctgctcaa agagccccgg gatgtacaga 240
 ccaagatccc taaggagaga tttagcgtcg atacatttta cagccccgat ggcactcacc 300
 ccgggcgcac gaacgcaccc tttagcactt tgctgcagga ggatctacgc ggttttgatg 360
 cctctttctt caacatccaa gctggagagg ccgaaacgat tgaccacacag caaaggctgc 420
 tgctggagac ggtctatgaa gctgtatcca acgcaggcct acggatccaa ggccttcaag 480
 gatcctctac tgctgtgtac gtcggtatga tgacgcatga ctatgagact atcgtgacgc 540
 gtgaattgga tagtattcct acatactctg ccacgggggt agctgtcagt gtggcctcca 600
 accgtgtatc atacttcttc gactggcatg ggccgagtat gacgatcgac acagcctgta 660
 gttcatcctt agctgccgtg catctggccg tccaacagct tagaacgggc gagagtacca 720
 tg 722

<210> 18

<211> 760

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 18

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg gactatcaac ggttttatca 60
 ccagggcgac tgatatatca gtcaatgaaa caacgttggg atgaacaata cccccccgt 120
 aaccgcaacc gcaaccgcaa ccgcaaccgc aaccgcaatg gcaggctcgg cttgctctaa 180
 cacatccacg cccattgccg tagtttgaat gggatgtcga tttagctggg atgcaacgag 240
 tccacagaag ctttgggaaa tggttgaaag aggaggcagt gcctgggtcta aggtcccctc 300
 ctgcgcattc aatgtgagag gagtatacca cccgaatggc gaaagggtcg ggtccacca 360
 cgtaaagggt ggacacttca tcgacgagga tcctgcttta tttagcggcg cgttcttcaa 420
 catgaccaca gaggtcgcca gctgcatgga tccgcagtat cggcttatgc ttgagggtgt 480
 ctacgaatcg ctggagagtg ccggtatcac catcgatggt atggcaggct ctaatacgtc 540
 ggtgtttggg ggtgtcatgt accacgacta tcaggattcg ctcaatcgtg accccgagac 600
 agttccgcgt tatttcataa ctggcaactc aggaacaatg ctttcgaacc ggatatacaca 660

cttctacgac ttacgtggtc ccagcgtgac ggttgacacg gcctgttcga cgacattgac 720
cgcaactgcac ttggcgtgcc agagcttacg tactggggag 760

<210> 19

<211> 773

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 19

ggccacgcgt cgactagtagc gggggggggg ggtttttttt ttttcaaggt tgactggaag 60
agtgtctctg gccacaaaat ccagaagca ttagtgctgt tattcgatta taaaccgtcg 120
cagcgtcttc attcttcgtt ctttcttctt ttccactggt gtgcataggt cctatctgtc 180
tcacgcaatg ctcggccagg ttcttctgac cgtcgaatcg taccaatggg tatcgacccc 240
tcaagccctt gtggcggtcg cagtgttct tagtctcatc gcctaccgtt tgcgggggcg 300
ccagtccgaa ctgcaagtct ataatcccaa aaaatggtgg gagttgacga ccatgagggc 360
taggcaggac ttcgatacgt atggtccgag ctggatcgaa gcttggttct cgaaaaacga 420
caagcccctg cgcttcattg ttgattccgg ctattgcacc atcctcccat cgtccatggc 480
cgacgagttt cggaataatca aagatatgtg catgtacaag tttttggcgg atgactttca 540
ctctcatctc cctggattcg acgggttcaa ggaaatctgc caggatgcac atcttgtcaa 600
caaagttggt ttgaaccagt tacaaccca agcccccaag tacacaaagc cattggctac 660
cttgcccgac gctactattg ccaagttggt cggtaaaagc gaggagtggc aaaccgcacc 720
tgtctattcc aatggattgg accttgtcac acgaacagtc acactcatta tgg 773

<210> 20

<211> 527

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 20

ggccacgcgt cgactagtagt gggggggggg gtacctagga actgttcagt tgtccctccc 60
 aaccccttgg gccgaacaac ctccctccaa tctacgacgg cagattatac ctaggcgcct 120
 aaccgattag gttgctcatt cgattttgga gagactacct agctataggt accactccaa 180
 gctgtagcac agacctttca gcatggtcgc ttcgttgcta cctctcgtt ttcgcggtag 240
 ggaatcaatg aatcagcagc accctctacg ctcgggaaat cgggcattga cctccacact 300
 ccaatttcta tccaaaacgg cgtgtctaca cccgatccat accgtttgca ccatagctat 360
 tctagctagt accacatacg ttggactact caaagacagc ttcttccatg gccccgaaa 420
 cgttgataaa gcagaatggg gctctttggt cgaaggaagt cgaagcttga tcaccggccc 480
 acagaatggc tggaagtggc agagcttcga cggggatgca gatgttc 527

<210> 21

<211> 522

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtagt gggggggggg gggggggggg ggatccatca atctgacttc 60
 aggctagcgg accttaacga aacaacgaga gcgagatcat tcatacacca aaacacaggt 120
 actatagaag cgccgcgcag tagagattca caccgcccct tgaagcaaaa gtcggaagga 180
 attgcgcgat gtcagaacct ctacccccta aagaaggga accaaggcca cagaaggaag 240
 aaagtcaaaa tgacacgctc gaagcgactg agtccaagtc ccagcacatc acaggcctca 300
 agctcgggct ggtggttgct tcagttactt tcgtagcatt tttgatgctc cttgatatgt 360
 ccattatcgt cacggcaatc ccacatatca caagcgagtt cactctctg aacgatgtag 420
 ggtggtacgg cagtgttat ctcttgcta actgtgctct ccagcccctg gccggtaaat 480
 tgtatacact cttgggcttg aagtacactt tctttgcctt cc 522

<210> 22

<211> 541

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 22

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg ggctcacctc acattatttg atcttaatcc 60
aataattatg tccctgccgc atgcaacgat tccgacgaac ctacgccgtc gcgcgtttcg 120
acgctcatgt gaccgggtgc atgcacaaaa gctcaaagt accggtagca atgccaattt 180
agtccgtgct cagtgtcaac gttgtcagca agccggatta aggtgtgtgt acagcgaaag 240
gctacccaag cgcaatttac ataaagaagc cgcagctgga actacaagag ccacagaaac 300
ctcacaaccg atgaccgcga catcttctac ggtcttctca tcattggcag agactcctcc 360
accttactgc tcaccaccta cgcatatttg cacctcggca ctcaaggaaa cattatcaga 420
accatcagcg gcaaccctgc aattctatga tacatcaatc aactttgatg atcccagatc 480
gtttcccggc ggctggcctc agccaaatac atttcgcgac gatgccaaca gcaatgaatc 540
t 541

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 23

atcataccat cttcaacaac 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 24

gctagaatag gttacaagcc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 25

acattgccag gcacccagac

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 26

caacgccc aa gctgccaatc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 27

gtcttttcct actatctacc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 28

ctttcccagc tgctactatc

20

<210> 29

<211> 1524

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 29

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttcaa cgaaggtaga 60
agtaattttg acaaagatac aagacgaatt cgctatttgt agatgaatat gcgtgtgtca 120
attgaagccg aattcaggat agatttgcca tctgctctat tgccaatttc taatccatct 180
ttatcatgaa caacactcaa accacacatc tgaattcacg gcgctgaacg atctaggcca 240
acttcagagc cgggttcacg gagaacatag tgaggattga agaaaagtgg tctacaaagg 300
cctgagcgtg ctcagggcc aacacgagc tctgaagttt gacatgaatg agtgggtcct 360
tggtagggtc atccacatc tcgagaacga tgcataagg agtgcgctca cgggaagcga 420
gaacactcgt catcttgcca ttgccaattg agccactctc cgcttgaccc tgcttgtaat 480
caaagacagc ctggaacaag ggggcgtgtg tctgagtctt gggttcctcg cctgaggtag 540
ggagattcag gcctagacag tcgaggatga cgccatacgg caccgcgcg tgttgcatgg 600
cctcacgcac actgtccttg gtggctacaa ggtgctcgcc gaatgtcttg ctgccacga 660
actcatcaaa gcgcagggga agcacgttag cgaaaaagcc catcgccgaa atttcttcca 720
tggtggatcg gttggtttcg gcgaggccga tggttatgtc tttgctgccg gtaagacgcg 780
ccaacaaaac gtggtaggcg gccaggtaga actgcatggg ggttgccctg tgcttgccgc 840
tccgctcttt gattcggaag gcgaccatgg gatctaaacg agcaattgct tcatactgct 900
gccacgtgaa tggtgtgatt tgctgctgct ctgaattggc agcagggtca ttgatcagat 960
tcatgatggg aagcacggtt ggcgcatatg acgagacttt gctatgcatg gacttccaga 1020
acgcgatatc gtccccatt cgcccatctt ccaggttttc ccgctgttgg acggctagat 1080
cagagaattg ggtcgtggt cgctgcattt tcaccccgct gtaaactctg ccgatctcat 1140

tgaacagggtt tttctgttgtt gagccatcac caactaatct gtggtagccg attaccaaca 1200
 ggtggtcatc tgtgccccag tagaaatcaa cgagtctgag agtgtcacct gtggagatgc 1260
 tatagtttgt cttctcgagt ttccggtact cttcctctgc ctccgcagcg ttgttcacct 1320
 gaacaaagtg cactctgttc tccgggttct tgagaaccac ttggacggga ccatttaaata 1380
 cgctgctata gtcacgcca gtaacaaagc acgtacggaa gatctcgtga cggcgcaatg 1440
 aggctttcag agcccgccctc aaccgggtcga ggtcaatggt acccttcacg aacatgccaa 1500
 tagtgttgtt gaagatggta tgat 1524

<210> 30

<211> 784

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 30

aactggaaga attcgcggcc gcaggaatct tttttttttt tttttttttc tttgttgctt 60
 ctcagggccca ctgtaatggt atttcaggta tctctattta ctgctatcca gaagtcaggc 120
 attaaatagt caggctcagc ccaggctcga ttcagattgg attcaggctt cagaccatgg 180
 ccgctatgct ccttcgtact atacctccgt cgagctatac ccgcttggcc agacaaaagg 240
 cttcaactgaa cccttcaact taactgcatt tcgccacaac taactcgacg aggccggcga 300
 tgggtgttacc attcatgagc tcaaagatcg acacatcaac atggatttca gatgtgatcc 360
 agtttcgaag ttcaatggcg acgagtgagt ctacgccgac acctgccagg ttttggacg 420
 aggacatgtc gtcttctgcc agaccaaaca ttcgcatcag cttttccgtc attgctttga 480
 ggacgataga aatggcctcg tcgtgagagg tgaccctgct tagttgggcc cgcacgccat 540
 ctggctccttt tttatgcgaa gagacaaagg attggtctgc atgaaggact tggcgggtatt 600
 taagtcccac aaaccgctgt tcctgtatcc agtttgcctc ggtccagtga gcacccgggg 660
 atgtgttgat tcctgtaacc acagctgcgg gaggtgatgg aaattgaggg gaagaacaca 720
 ggattgcctt ctccaacaca tccatgacgt ctttttcacg cataggcttg taacctattc 780
 tagc 784

<210> 31

<211> 764

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 31

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttc gaataaaatg 60
cgttttatatt tactaaccta ctcgactaat acagcaccta gtttctctgg gacggaaacc 120
attggaataa gcctggggac ggatgcataat ttgttttagt ttgcgtgtta tatcttagca 180
ccggatcatga gggagcggga tgtcctcggt gcgccggcgt accatgagct ttgtggttgg 240
atgcatacga acgctaaaag cgtgacggta gtatttgtca tcgtctcctg gtacaggcctt 300
cacatcatac tgaatcagta tatgagcgag gagaatcttg atttccttcg aggcgaagaa 360
ccgcccggga caagcgcgtg gggtccagcc gaagccgatg tgatcaccgt tggtattctc 420
caattgagcg gtgaaggcct tgtctggatc ctcgcgcgat cgcataaatc ggtagggatc 480
ataattttcg gggttttccc acacatcagg gttgttcatg cggctcgcag ccacagcggc 540
caactcgccc ttgggaatga agaggccatt ggatagagtg atgtctctga gagcgggtact 600
gcgcatagtg gcgcactcga ccggcttgat tcgctgcgtc tctttcatgc agctgtcgag 660
gagcttcagc ttgaacagag aggcaggcgt ccagccccct tctccgatta cagtgcggat 720
ctcttgccgg agaggctgaa taaggctctg gtgcctggca atgt 764
```

<210> 32

<211> 765

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 32

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttctgg aaaaggacca 60
tctctttata tattcttctt ccctactact tgcacgtaa atttcaaca catataaaca 120
tgagataccc tttctggccg ttactctac cacctgcctg tctcattgca ttgtgctttt 180
```

gaaaattatg acaataacaa ccaatgagaa aaaatatgat cctcctgcaa tgaatccact 240
 ggagggggta cggagcttgg aatgctccta agattccgac ctaatcagcg tcgagcccga 300
 tcagtagctg cagcactcgg cctcagtgca ttgttaggaa cagggactgt cctggttccg 360
 cctgacgggg agacacttcg agaaggggct gaagatgccg gggcagaacg gttgtgcgcc 420
 atgtgcgcct tgaccaggtg accggcggct agggcagcac atagcgagag ctccccagcc 480
 aaaacagcgc ttccgatgat gcgcgcaagt tgacgtgcat tctcaccggg agtggtcggg 540
 tgtgatccgc ggacaccaag catgtcaagc attgcgcctt ggggctccag aatcgtacca 600
 ccgcccacg ttccaacctc aatagacggc atggagacag agatttgaag cgatccgcga 660
 agattgttca tgagagtgat gcagtttagc ctctccacaa cttgcgccg atcctgacct 720
 gtggcaatga aaatggctgc cgcaagattg gcagcttggg cgttg 765

<210> 33

<211> 802

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 33

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt ttttttttt tttttataga atctttgaaa 60
 tcgacattaa ttaagtatgt ggagattctt tgtggaggca cggtaatgtg tctatctagc 120
 aacgcggtca agcatcagtc tcaggcacag cccgggtgtc gtttttggtt gcaatcttcc 180
 gccatcccat tccaaaggca aacacaaacg tgcacgccgt agctcccact gctaagtaaa 240
 aagtatgata aacggcgaga ctgtaagctt ttacaacccc tggaagggtta ttcttgctga 300
 ccacatctct gaagccagtc gcccctgctg ccgtcacggc ctgcgtgtcg acagtgggcg 360
 catacttgct caggccagtt ctcaaaccgg acccaaagac aaggtttagca aagtccagga 420
 agagcgatcc tccaaacgtc tgtccaaaca cggcgagaga aattccgagg gcacctgtt 480
 cgggcgaaag cgtgctttgg atggcgatga taggcgtttg catgccacaa ccacgaccga 540
 agcccgcgat aaattggtac atgacccatt tcacagttga tgtatggggc tggaagggtg 600
 ataccagacc tgcgcctatg gcgacgagaa cagcgctgcc tagggcccaa ggcaaatagt 660
 atcctgtctt tccaattgcg aagccagaaa ccatagccat aatgacttgt ccaagaattc 720

caggcaacat gtacacacca ctacagtgtgg gagaaacatc cttcacagcc tggaagtaga 780
tcggtagata gtaggaaaag ac 802

<210> 34

<211> 562

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 34

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttac taagcaatat 60
tgtgtttctt cgctaattgcg aatatttcct tatagcaacg tcgcaacaca tttatcgtct 120
tccctgaggc ctttgttgac ttgggctctt cgtctccggc ttcgtcactc caaagcacag 180
ataggagacg agaggccggc gttatggttt tattttcagc gcccaaggatt tgccacgatg 240
tgcttggcat atctgatagg actagacgaa tagatgccgc agccccgtgc tcctgtgcta 300
tccccaaagc agtctcaatc ccactcaata gtcgaaggct tacacgcaat gtcgtgcatg 360
cagaagataa ggcgtgcatg aatgggtcga gatgtgaaat gagctcgccg atatgaagat 420
tagagtgaaa cgagggaagt gcttcggctc ttccattgtc atttctagtg gttgagccag 480
accagtacca atccattcgt gtgctttgct tttgtccaca aggttgggct ttcacacct 540
cggatagtag cagctgggaa ag 562

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 35

gttaacatgt cagaacctct accccc 26

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 36

aatatttcaa gcatcagtct caggcac

27

<210> 37

<211> 1662

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1662)

<400> 37

atg tca gaa cct cta ccc cct aaa gaa ggg gaa cca agg cca cag aag 48

Met Ser Glu Pro Leu Pro Pro Lys Glu Gly Glu Pro Arg Pro Gln Lys

1

5

10

15

gaa gaa agt caa aat gac acg ctc gaa gcg act gag tcc aag tcc cag 96

Glu Glu Ser Gln Asn Asp Thr Leu Glu Ala Thr Glu Ser Lys Ser Gln

20

25

30

cac atc aca ggc ctc aag ctc ggg ctg gtg gtt gct tca gtt act ttc 144

His Ile Thr Gly Leu Lys Leu Gly Leu Val Val Ala Ser Val Thr Phe

35

40

45

gta gca ttt ttg atg ctc ctt gat atg tcc att atc gtc acg gca atc 192
Val Ala Phe Leu Met Leu Leu Asp Met Ser Ile Ile Val Thr Ala Ile
50 55 60

cca cat atc aca agc gag ttc cac tct ctg aac gat gta ggg tgg tac 240
Pro His Ile Thr Ser Glu Phe His Ser Leu Asn Asp Val Gly Trp Tyr
65 70 75 80

ggc agt gct tat ctt ctg gct aac tgt gct ctc cag ccc ctg gcc ggt 288
Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ala Asn Cys Ala Leu Gln Pro Leu Ala Gly
85 90 95

aaa ttg tat aca ctc ttg ggc ttg aag tac act ttc ttt gcc ttc ctc 336
Lys Leu Tyr Thr Leu Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Phe Phe Ala Phe Leu
100 105 110

tgt att ttt gaa cta ggc tcg gtg cta tgc ggt gcc gca aga tct tcc 384
Cys Ile Phe Glu Leu Gly Ser Val Leu Cys Gly Ala Ala Arg Ser Ser
115 120 125

acc atg ttg att gtt ggg cgg gcc gtt gct gga atg gga ggc tca ggt 432
Thr Met Leu Ile Val Gly Arg Ala Val Ala Gly Met Gly Gly Ser Gly
130 135 140

ctt gtc aac gga gcc ctc aca atc ctc tca aca gct gct cct aag cac 480
Leu Val Asn Gly Ala Leu Thr Ile Leu Ser Thr Ala Ala Pro Lys His
145 150 155 160

aag caa cca gtt ttg att gga gtg atg atg ggt ctt agt cag att gcc 528

Lys Gln Pro Val Leu Ile Gly Val Met Met Gly Leu Ser Gln Ile Ala

165

170

175

att gtc tgt gga cca ctg ctc gga ggt gct ttc act caa cac gcc act 576

Ile Val Cys Gly Pro Leu Leu Gly Gly Ala Phe Thr Gln His Ala Thr

180

185

190

tgg cga tgg tgc ttt tat atc aat ctc ccc atc ggc gct gtc gct gca 624

Trp Arg Trp Cys Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ala Val Ala Ala

195

200

205

ttc ctc ctt ctc gtc atc acc ata ccc gac cga att tca tcc acg gac 672

Phe Leu Leu Leu Val Ile Thr Ile Pro Asp Arg Ile Ser Ser Thr Asp

210

215

220

agc gaa ctc tcg acc gac aaa cca atg gcc aac ata aaa tcc aca ctt 720

Ser Glu Leu Ser Thr Asp Lys Pro Met Ala Asn Ile Lys Ser Thr Leu

225

230

235

240

cgc aaa ctg gac ctt gta ggc ttt gtg gtc ttt gca gcc ttc gca acc 768

Arg Lys Leu Asp Leu Val Gly Phe Val Val Phe Ala Ala Phe Ala Thr

245

250

255

atg att tcc ctc gca cta gaa tgg gga ggg tcg acc tac acc tgg cga 816

Met Ile Ser Leu Ala Leu Glu Trp Gly Gly Ser Thr Tyr Thr Trp Arg

260

265

270

agt tcc gtc atc atc ggc ctg ttc tgt ggc gga ggg ttt gct ctg att 864

Ser Ser Val Ile Ile Gly Leu Phe Cys Gly Gly Gly Phe Ala Leu Ile

275	280	285	
gcg ttc gtg cta tgg gag cgt cat gtt ggc gat gct gtt gcc atg att 912			
Ala Phe Val Leu Trp Glu Arg His Val Gly Asp Ala Val Ala Met Ile			
290	295	300	
cct ggc tca gtg gct ggt aaa cga caa gtg tgg tgc tct tgt tta ttt 960			
Pro Gly Ser Val Ala Gly Lys Arg Gln Val Trp Cys Ser Cys Leu Phe			
305	310	315	320
atg ggc ttt ttc tct ggc tcc ttg ctt gtc ttt tcc tac tat cta ccg 1008			
Met Gly Phe Phe Ser Gly Ser Leu Leu Val Phe Ser Tyr Tyr Leu Pro			
	325	330	335
atc tac ttc cag gct gtg aag gat gtt tct ccc aca ctg agt ggt gtg 1056			
Ile Tyr Phe Gln Ala Val Lys Asp Val Ser Pro Thr Leu Ser Gly Val			
	340	345	350
tac atg ttg cct gga att ctt gga caa gtc att atg gct atg gtt tct 1104			
Tyr Met Leu Pro Gly Ile Leu Gly Gln Val Ile Met Ala Met Val Ser			
	355	360	365
ggc ttc gca att gga aag aca gga tac tat ttg cct tgg gcc cta ggc 1152			
Gly Phe Ala Ile Gly Lys Thr Gly Tyr Tyr Leu Pro Trp Ala Leu Gly			
	370	375	380
agc gct gtt ctc gtc gcc ata ggc gca ggt ctg gta tcc acc ttc cag 1200			
Ser Ala Val Leu Val Ala Ile Gly Ala Gly Leu Val Ser Thr Phe Gln			
	385	390	395
			400

ccc cat aca tca act gtg aaa tgg gtc atg tac caa ttt atc gcg ggc 1248

Pro His Thr Ser Thr Val Lys Trp Val Met Tyr Gln Phe Ile Ala Gly

405

410

415

ttc ggt cgt ggt tgt ggc atg caa acg cct atc atc gcc atc caa agc 1296

Phe Gly Arg Gly Cys Gly Met Gln Thr Pro Ile Ile Ala Ile Gln Ser

420

425

430

acg ctt tcg ccc gaa caa ggt gcc ctc gga att tct ctc gcc gtg ttt 1344

Thr Leu Ser Pro Glu Gln Gly Ala Leu Gly Ile Ser Leu Ala Val Phe

435

440

445

gga cag acg ttt gga gga tcg ctc ttc ctg gac ttt gct aac ctt gtc 1392

Gly Gln Thr Phe Gly Gly Ser Leu Phe Leu Asp Phe Ala Asn Leu Val

450

455

460

ttt ggg tcc ggt ttg aga act ggc ctg agc aag tat gcg ccc act gtc 1440

Phe Gly Ser Gly Leu Arg Thr Gly Leu Ser Lys Tyr Ala Pro Thr Val

465

470

475

480

gac acg cag gcc gtg acg gca gca ggg gcg act ggc ttc aga gat gtg 1488

Asp Thr Gln Ala Val Thr Ala Ala Gly Ala Thr Gly Phe Arg Asp Val

485

490

495

gtc agc aag aat aac ctt cca ggg gtt gta aaa gct tac agt ctc gcc 1536

Val Ser Lys Asn Asn Leu Pro Gly Val Val Lys Ala Tyr Ser Leu Ala

500

505

510

gtt gat cat act ttt tac tta gca gtg gga gct acg gcg tgc acg ttt 1584
Val Asp His Thr Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ala Thr Ala Cys Thr Phe
515 520 525

gtg ttt gcc ttt gga atg gga tgg cgg aag att gca acc aaa aac gac 1632
Val Phe Ala Phe Gly Met Gly Trp Arg Lys Ile Ala Thr Lys Asn Asp
530 535 540

acc cgg gct gtg cct gag act gat gct tga 1662
Thr Arg Ala Val Pro Glu Thr Asp Ala
545 550

<210> 38

<211> 553

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 38

Met Ser Glu Pro Leu Pro Pro Lys Glu Gly Glu Pro Arg Pro Gln Lys
1 5 10 15
Glu Glu Ser Gln Asn Asp Thr Leu Glu Ala Thr Glu Ser Lys Ser Gln
20 25 30
His Ile Thr Gly Leu Lys Leu Gly Leu Val Val Ala Ser Val Thr Phe
35 40 45
Val Ala Phe Leu Met Leu Leu Asp Met Ser Ile Ile Val Thr Ala Ile
50 55 60
Pro His Ile Thr Ser Glu Phe His Ser Leu Asn Asp Val Gly Trp Tyr
65 70 75 80
Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ala Asn Cys Ala Leu Gln Pro Leu Ala Gly

85	90	95
Lys Leu Tyr Thr Leu Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Phe Phe Ala Phe Leu		
100	105	110
Cys Ile Phe Glu Leu Gly Ser Val Leu Cys Gly Ala Ala Arg Ser Ser		
115	120	125
Thr Met Leu Ile Val Gly Arg Ala Val Ala Gly Met Gly Gly Ser Gly		
130	135	140
Leu Val Asn Gly Ala Leu Thr Ile Leu Ser Thr Ala Ala Pro Lys His		
145	150	155
Lys Gln Pro Val Leu Ile Gly Val Met Met Gly Leu Ser Gln Ile Ala		
165	170	175
Ile Val Cys Gly Pro Leu Leu Gly Gly Ala Phe Thr Gln His Ala Thr		
180	185	190
Trp Arg Trp Cys Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ala Val Ala Ala		
195	200	205
Phe Leu Leu Leu Val Ile Thr Ile Pro Asp Arg Ile Ser Ser Thr Asp		
210	215	220
Ser Glu Leu Ser Thr Asp Lys Pro Met Ala Asn Ile Lys Ser Thr Leu		
225	230	235
Arg Lys Leu Asp Leu Val Gly Phe Val Val Phe Ala Ala Phe Ala Thr		
245	250	255
Met Ile Ser Leu Ala Leu Glu Trp Gly Gly Ser Thr Tyr Thr Trp Arg		
260	265	270
Ser Ser Val Ile Ile Gly Leu Phe Cys Gly Gly Gly Phe Ala Leu Ile		
275	280	285
Ala Phe Val Leu Trp Glu Arg His Val Gly Asp Ala Val Ala Met Ile		
290	295	300
Pro Gly Ser Val Ala Gly Lys Arg Gln Val Trp Cys Ser Cys Leu Phe		
305	310	315
		320

Met Gly Phe Phe Ser Gly Ser Leu Leu Val Phe Ser Tyr Tyr Leu Pro
325 330 335

Ile Tyr Phe Gln Ala Val Lys Asp Val Ser Pro Thr Leu Ser Gly Val
340 345 350

Tyr Met Leu Pro Gly Ile Leu Gly Gln Val Ile Met Ala Met Val Ser
355 360 365

Gly Phe Ala Ile Gly Lys Thr Gly Tyr Tyr Leu Pro Trp Ala Leu Gly
370 375 380

Ser Ala Val Leu Val Ala Ile Gly Ala Gly Leu Val Ser Thr Phe Gln
385 390 395 400

Pro His Thr Ser Thr Val Lys Trp Val Met Tyr Gln Phe Ile Ala Gly
405 410 415

Phe Gly Arg Gly Cys Gly Met Gln Thr Pro Ile Ile Ala Ile Gln Ser
420 425 430

Thr Leu Ser Pro Glu Gln Gly Ala Leu Gly Ile Ser Leu Ala Val Phe
435 440 445

Gly Gln Thr Phe Gly Gly Ser Leu Phe Leu Asp Phe Ala Asn Leu Val
450 455 460

Phe Gly Ser Gly Leu Arg Thr Gly Leu Ser Lys Tyr Ala Pro Thr Val
465 470 475 480

Asp Thr Gln Ala Val Thr Ala Ala Gly Ala Thr Gly Phe Arg Asp Val
485 490 495

Val Ser Lys Asn Asn Leu Pro Gly Val Val Lys Ala Tyr Ser Leu Ala
500 505 510

Val Asp His Thr Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ala Thr Ala Cys Thr Phe
515 520 525

Val Phe Ala Phe Gly Met Gly Trp Arg Lys Ile Ala Thr Lys Asn Asp
530 535 540

Thr Arg Ala Val Pro Glu Thr Asp Ala

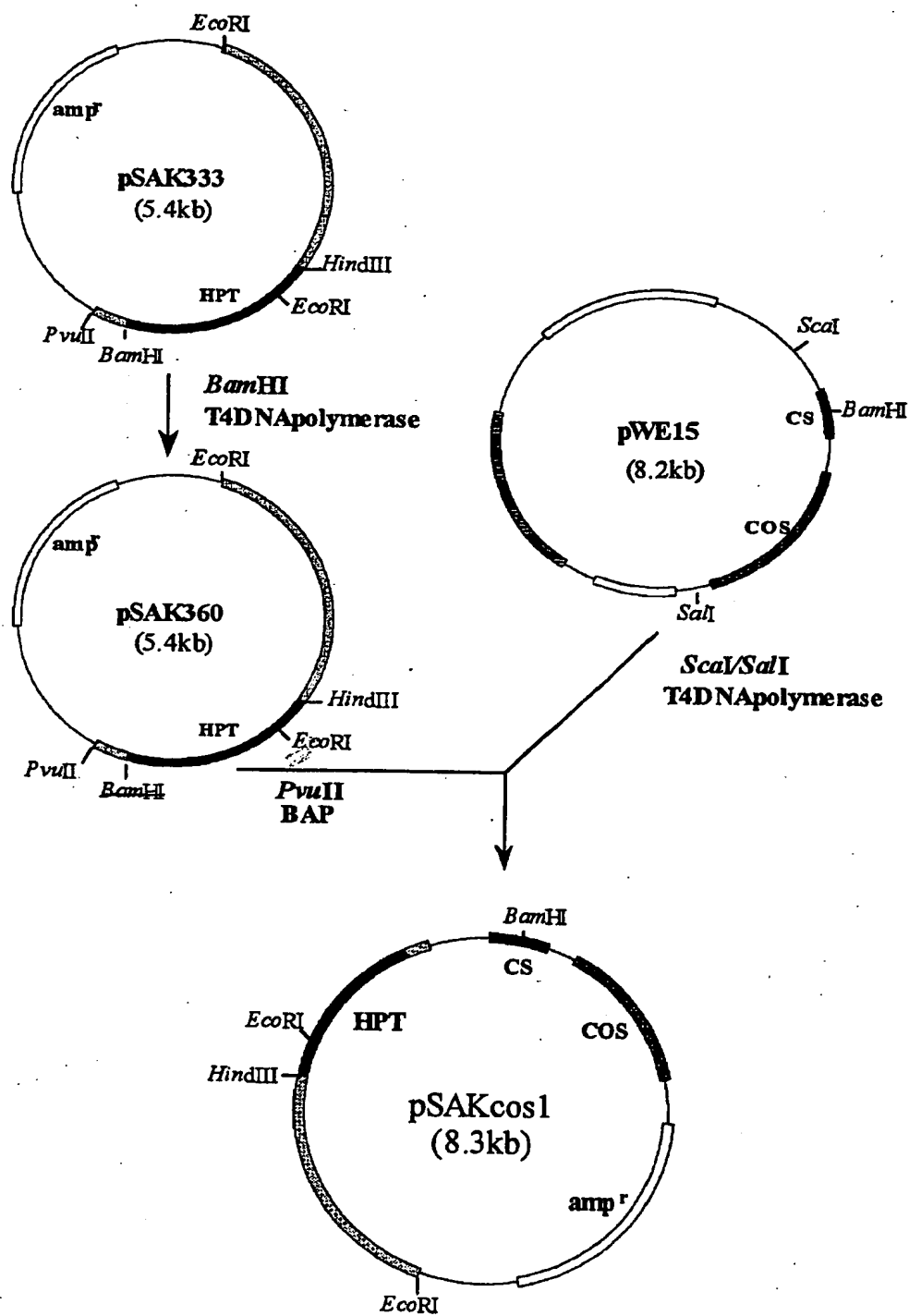
特 2 0 0 0 - 1 1 6 5 9 1

545

550

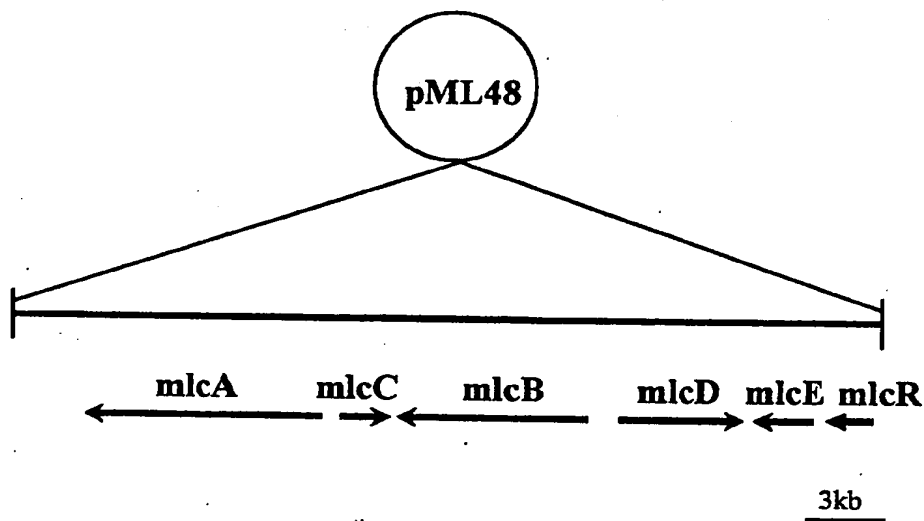
【書類名】 図面

【図1】



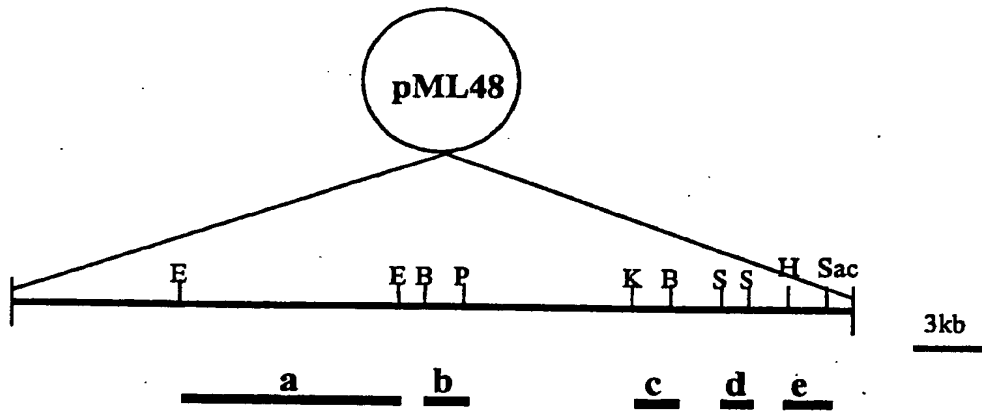
【図 2】

pML48 挿入配列上の推定構造遺伝子 (mlcA, mlcB, mlcC, mlcD, mlcE, mlcR) の位置、
大きさ及び方向



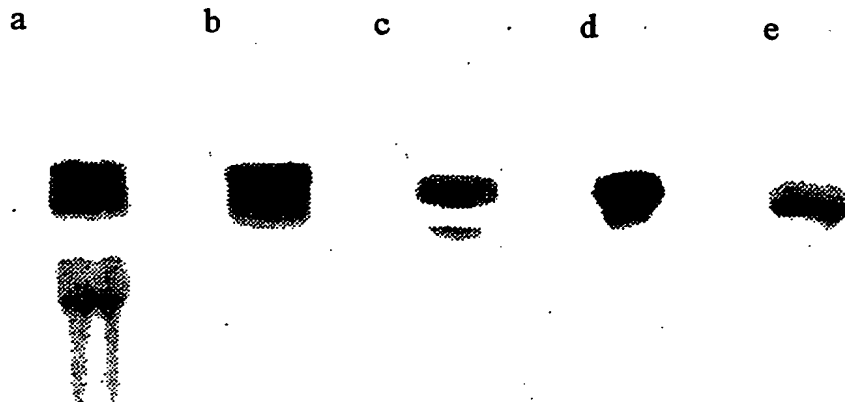
【図3】

A ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションに使用したプローブ (a,b,c,d,e) の位置

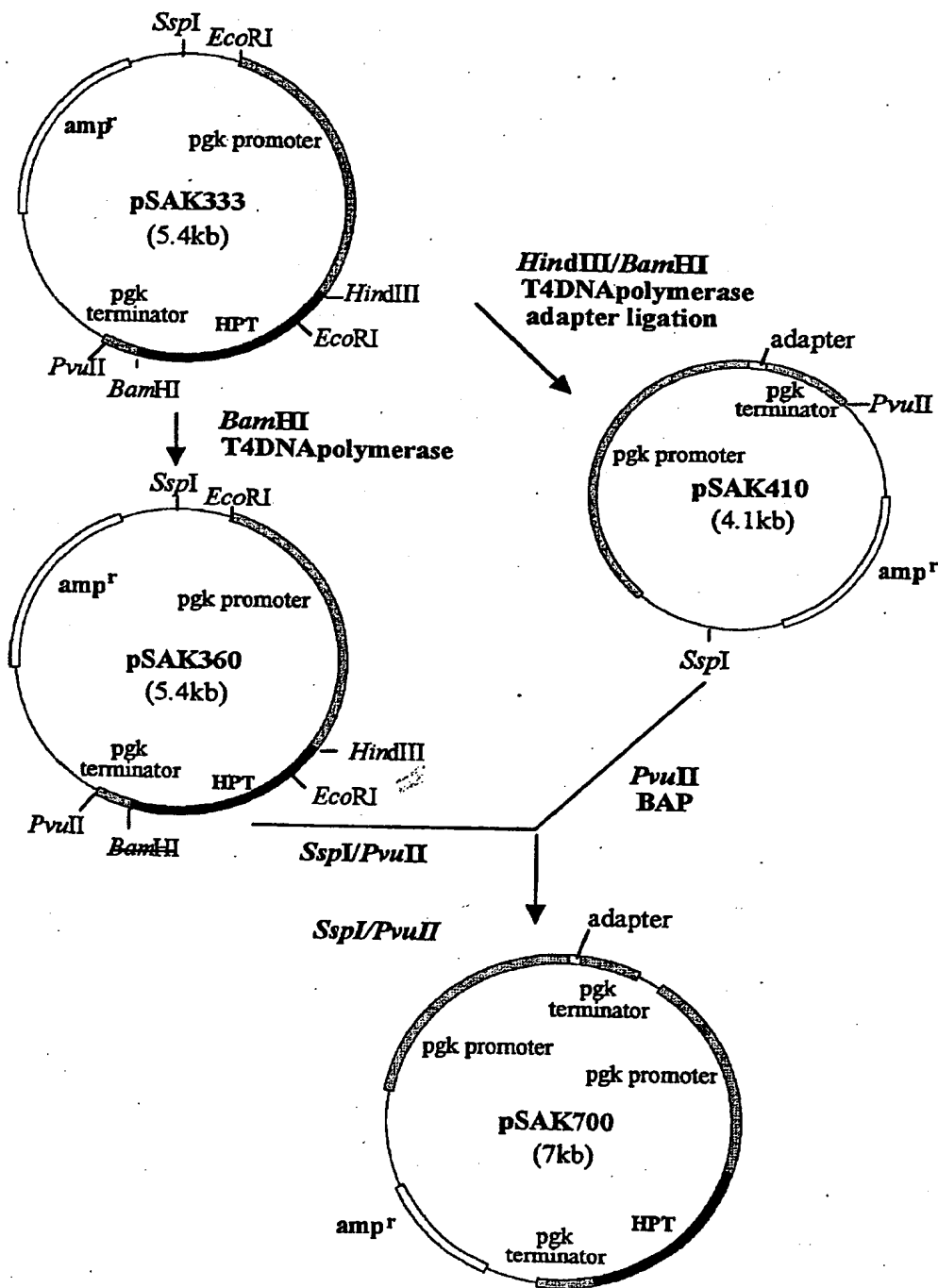


E; EcoRI, B; BamHI, P; PstI, K; KpnI, S; SalI, H; HindIII, Sac; SacI

B ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションの結果



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ML-236B の生合成を促進する DNA を取得すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 37 のヌクレオチド番号 1 乃至 1662 で示される塩基配列を 1 つ以上含むことからなり、ML-236B 生産菌内に導入されることにより該菌の ML-236B 生合成を促進することを特徴とする DNA を提供すること。

【選択図】 なし。

特 2000-116591

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-116591
受付番号	50000488134
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 4月19日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 4月18日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001856]

1. 変更年月日 1990年 8月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

氏 名 三共株式会社